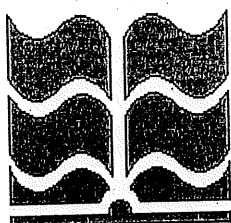


Universidad de Buenos Aires
Facultad de Agronomía



CÁTEDRA DE BIOQUÍMICA

BIOQUÍMICA
AGRÍCOLA

MÓDULO II

GUÍA DE ESTUDIO

Edición 2007

Centro de Impresiones

TEMA 1: BIOENERGÉTICA

ESQUEMAS (*)

CONTENIDOS

- CARACTERISTICAS DE LOS SERES VIVOS
- TIPOS DE NUTRICION
- CICLO DEL CARBONO
- PRINCIPIOS DE LA TERMODINAMICA
- ESPONTANEIDAD DE UNA REACCION QUIMICA
- REACCIONES ACOPLADAS
- EL GRUPO FOSFATO - ATP

(*) Nota: Los esquemas utilizados en este teórico-práctico han sido extraídos del libro "BIOENERGÉTICA-Introducción al estudio de la Bioquímica". Editorial Facultad Agronomía, 2004. Gustavo D. Trincherro.

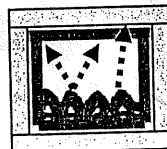
SISTEMAS TERMODINAMICOS



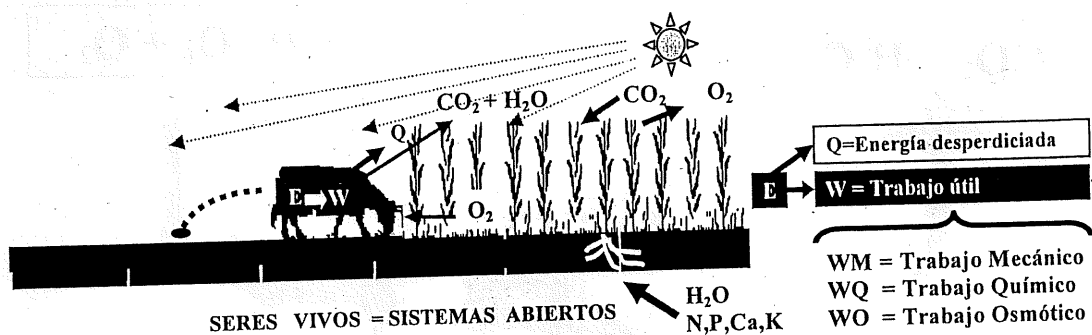
ABIERTO



CERRADO

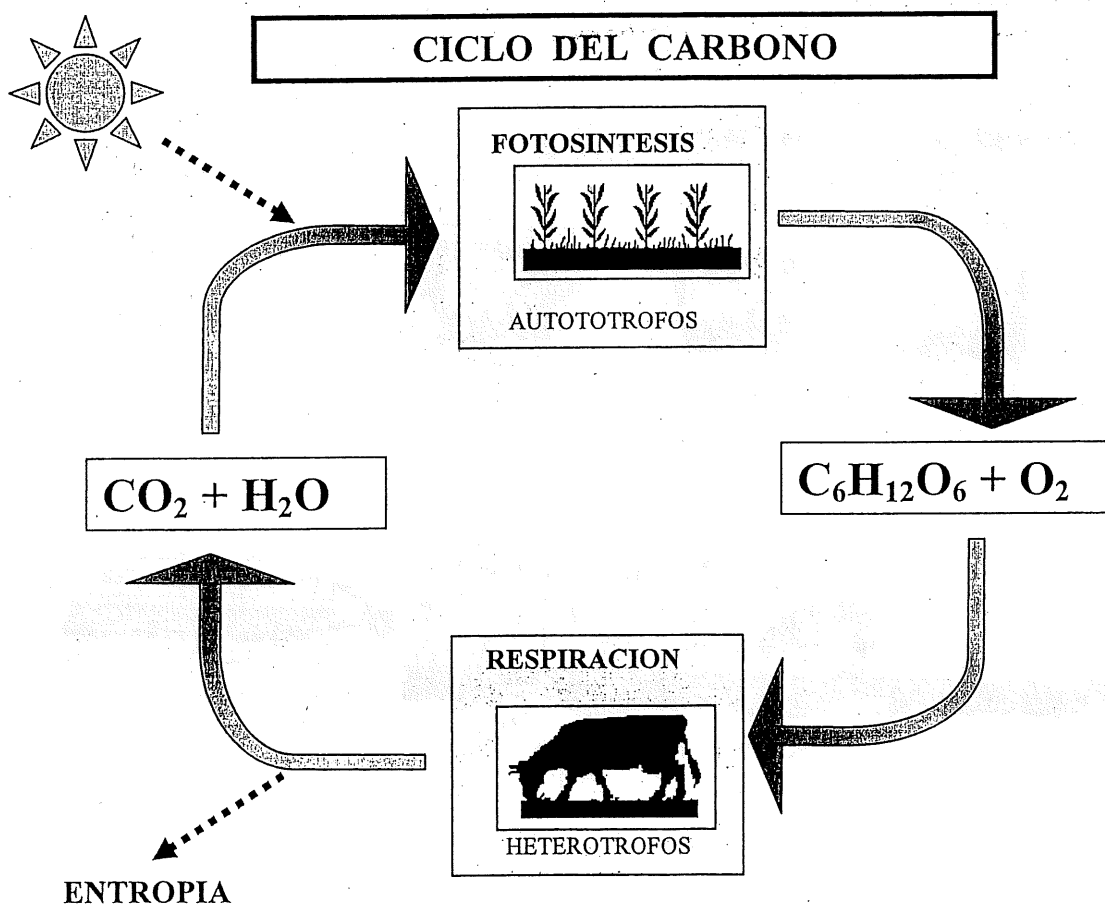


AISLADO



TIPOS DE NUTRICION DE LOS SERES VIVOS

		REQUERIMIENTOS DE ENERGIA	
REQUERIMIENTOS DE MATERIA	AUTOTROFOS	FOTOTROFOS Utilizan energía luminosa 	QUIMIOTROFOS Utilizan energía química 
	Requieren materia inorgánica CO_2 , NO_3^- , H_2O , etc. 	FOTOSINTETIZADORES * Bacterias sulfurosas * Algas verdeazuladas * Plantas 	QUIMIOSINTETIZADORES * Bacterias nitrificantes * Bacterias oxidantes de S, Fe, H
	HETEROTROFOS Requieren materia orgánica e inorgánica Azúcares, proteínas, lípidos, H_2O , etc. 	FOTO-ORGANOTROFOS * Bacterias no sulfurosas púrpuras	QUIMIO-ORGANOTROFOS * La mayoría de las bacterias (parásitas, saprófitas, simbiosis) * Protozoos * hongos * animales 



PRINCIPIOS DE LA TERMODINAMICA

PRIMER PRINCIPIO (O PRINCIPIO DE CONSERVACIÓN DE LA ENERGIA)

Aunque la energía puede convertirse de una forma a otra no puede crearse ni destruirse

TRANSDUCCION DE ENERGIA

$$\Delta E_{\text{universo}} = 0 = \Delta E_{\text{sistema}} + \Delta E_{\text{entorno}}$$

o sea:

$$\Delta E_{\text{sistema}} = - \Delta E_{\text{entorno}}$$

También puede expresarse:

Siempre que en un sistema desaparece una cantidad de una clase de energía debe producirse, en el sistema o en su entorno, una cantidad exactamente equivalente de otra/s clases.

Teniendo en cuenta el sistema solamente, puede escribirse:

$$\Delta E_{\text{sistema}} = Q + W$$

Cuando un sistema cambia de un estado A (inicial) a uno B (final), puede ganar o perder energía en forma de calor (Q) o trabajo (W). Lo que dice la ecuación anterior es que en cualquier transformación físico-química el **cambio de energía interna del sistema** ($\Delta E_{\text{sistema}}$) es la suma del calor y trabajo intercambiado entre sistema y entorno.

SEGUNDO PRINCIPIO

En cualquier proceso espontáneo la entropía del universo aumenta

O sea: proceso espontáneo

$\Rightarrow$

$$\Delta S_{\text{universo}} > 0$$

Spontáneo

En un proceso que se encuentra en equilibrio la entropía del universo es constante

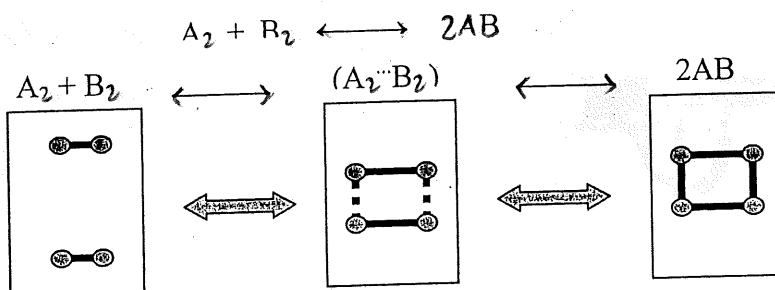
O sea: proceso en equilibrio

$\Rightarrow$

$$\Delta S_{\text{universo}} = 0$$

Equilibrio

TERMODINAMICA DE REACCIONES QUIMICAS



$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Si $H_f < H_i \Rightarrow \Delta H < 0 \Rightarrow$ reacción exotérmica

Si $S_f > S_i \Rightarrow \Delta S > 0 \Rightarrow$ aumento de entropía

Si $\Delta G < 0 \Rightarrow$ reacción procede espontáneamente $\longrightarrow$

Si $\Delta G = 0 \Rightarrow$ reacción en equilibrio $\longleftrightarrow$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 2,3 RT \log [P/R]$$

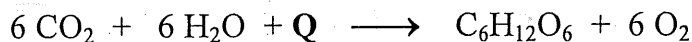
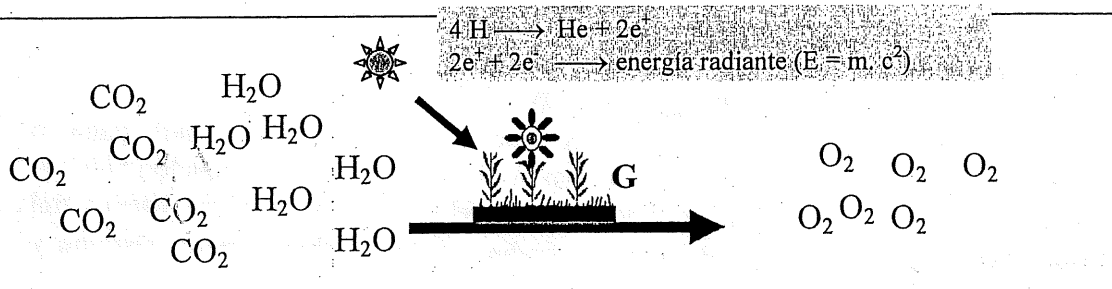
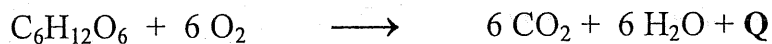
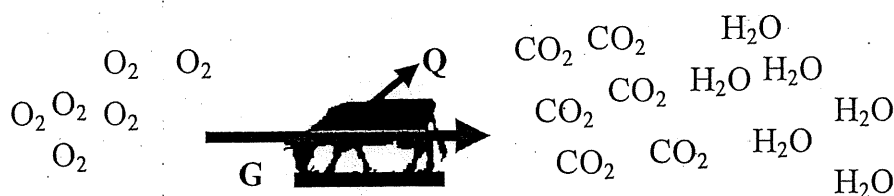
ΔG : Variación de Energía Libre: Capacidad que tiene una reacción química de realizar un trabajo

Variación de Entalpía: ΔH : Calor que desprende la reacción a P cte.

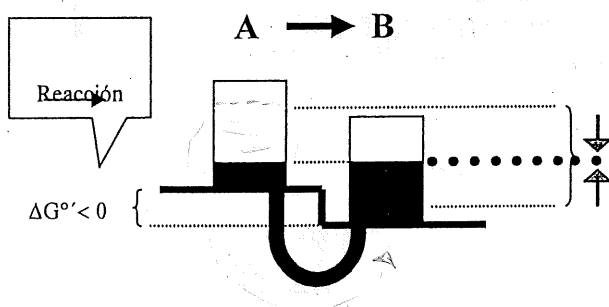
$\Delta H < 0$ Exotérmica

$\Delta H > 0$ Endotérmica

ENTROPIA



ENERGIA LIBRE DE REACCIONES



$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + 2,3 \text{ RT} \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$\Delta G' < 0 \Rightarrow$ reacción espontánea ($\rightarrow$)

En el equilibrio: $\Delta G' = 0$

$$\text{luego } \Delta G^{\circ'} = - 2,3 \text{ RT} \log \frac{[\text{B}]_{\text{eq}}}{[\text{A}]_{\text{eq}}}$$

$$\text{o sea } \Delta G^{\circ'} = - 2,3 \text{ RT} \log K_{\text{eq}}$$

$K_{\text{eq}} > 1$	$\Delta G^{\circ'} < 0$	Reac. Exergónica ($\rightarrow$)
$K_{\text{eq}} = 1$	$\Delta G^{\circ'} = 0$	
$K_{\text{eq}} < 1$	$\Delta G^{\circ'} > 0$	Reac. Endergónica ($\leftarrow$)

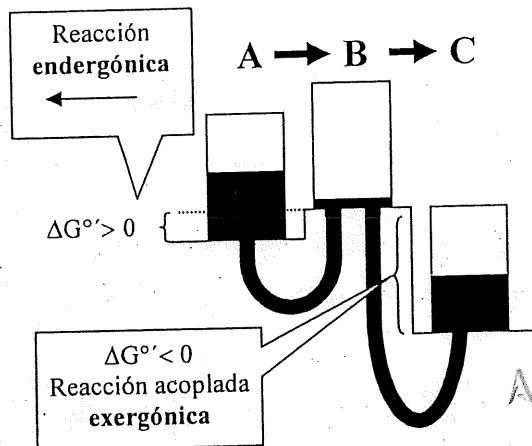
$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{C}]}{[\text{A}][\text{B}]}$$

ΔG° : Variación de Energía Libre Estándar

s: ΔG° alto y negativo $\Rightarrow$ Reacción Irreversible ($\Delta G < -10 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$)

ΔG° a pH 7 y 25°C IM

REACCIONES ACOPLADAS



$A \rightarrow B = \text{Endergónico} = \text{Desfavorable}$

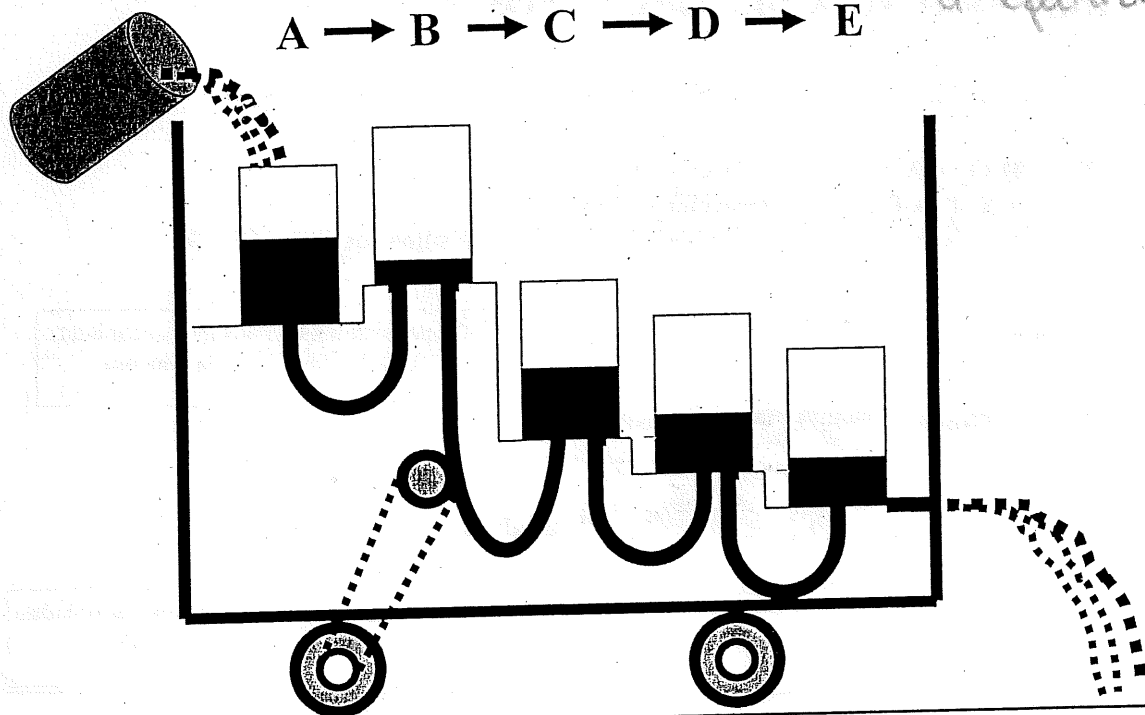
Ejemplo:

$\Delta G^\circ_{A \rightarrow B} = +3,5 \text{ Kcal/mol}$ (reac. endergónica) → Desfavorable

+
 $\Delta G^\circ_{B \rightarrow C} = -7,3 \text{ Kcal/mol}$ (reac. muy exergónica) → Favorable

$\Delta G^\circ_{A \rightarrow C} = -4,2 \text{ Kcal/mol}$ (reac. global exergónica)

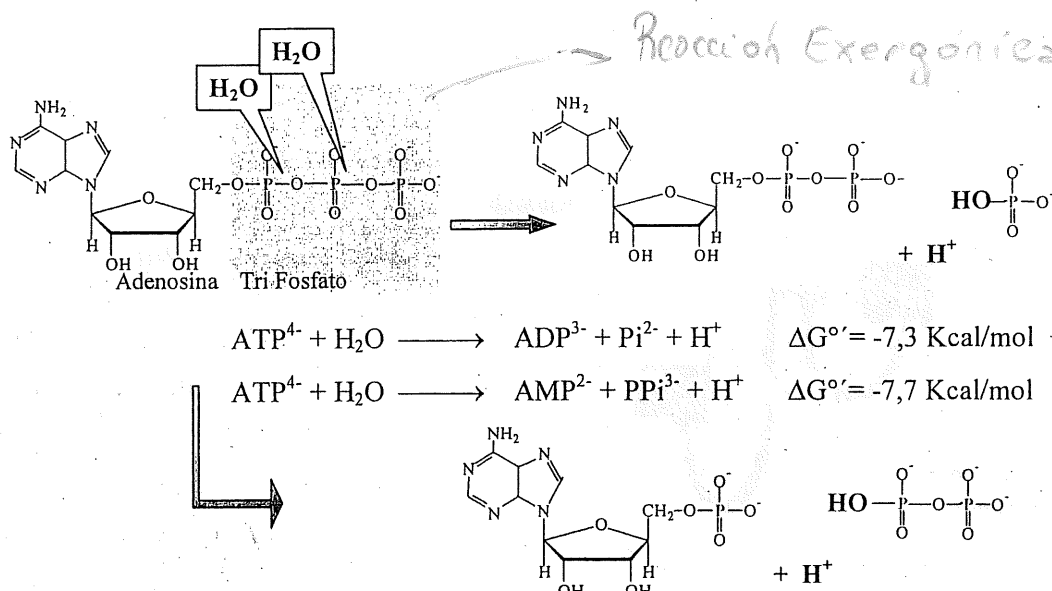
Acoplamos $C \Rightarrow B \rightarrow C = \text{Muy Exergónico}$
Favorable



Reacción Exergónica ($\rightarrow$): favorables, son capaces de producir un W útil. (termodinámicamente)

Si: Muy Exergónico $\Rightarrow$ Reacción Total

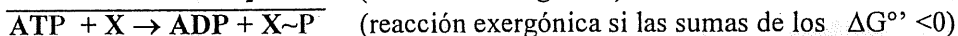
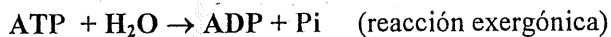
ATP : NUCLEOTIDO TRANSPORTADOR DE ENERGIA



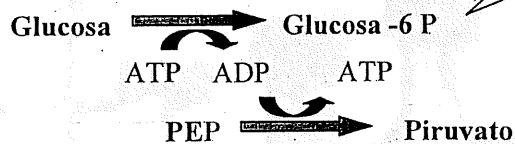
OTROS COMPUESTOS ENERGETICOS: GTP (Guanosin Tri Fosfato); UTP (Uridin Tri Fosfato)

TRANSFERENCIA DEL GRUPO FOSFATO ~P

Una expresión general de la capacidad fosforilante del ATP puede escribirse:



Ejemplo:

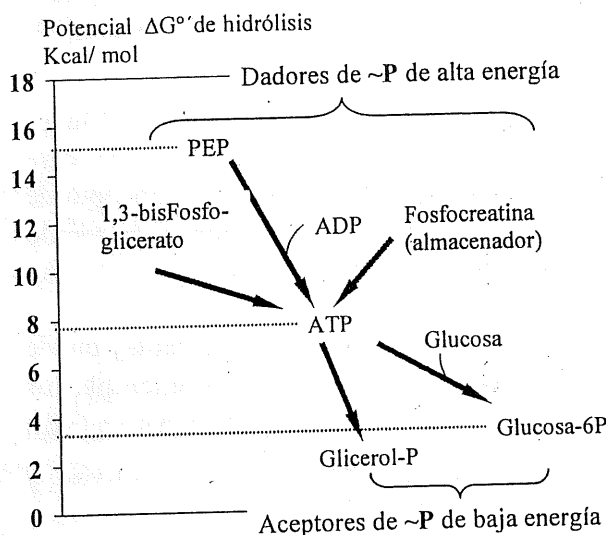


Primer sistema de reacciones acopladas
El ATP fosforiló a la Glucosa

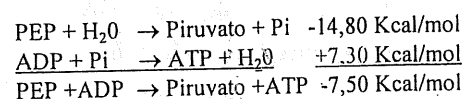
Segundo sistema de reacciones acopladas
El PEP fosforiló al ADP

~ → Enlace de Alta Energía

POTENCIAL DE TRANSFERENCIA DEL GRUPO FOSFATO ~P



Compuesto	ΔG° de hidrólisis $X-P + H_2O \rightarrow X + P_i$
PEP	-14,80 Kcal/ mol
1,3-bisFosfoglicerato	-11,80 Kcal/ mol
Fosfocreatina	-10,30 Kcal/ mol
ATP	-7,30 Kcal/ mol
Glucosa-6P	-3,30 Kcal/ mol
Glicerol-P	-2,20 Kcal/ mol



BIOENERGÉTICA: SUMARIO DE CONCEPTOS FUNDAMENTALES

* Los seres vivos, que son **sistemas abiertos** (ver def.) **que operan a P y T constantes**, intercambian con el entorno materia y energía con el objetivo de asegurar su supervivencia y multiplicación (ver propiedades de los seres vivos).

* Esa **materia y energía** es asimilada o utilizada para la **construcción (o biosíntesis)** de sus propias estructuras (constituidas por **C, H, O y N** principalmente) liberándose al medio parte de materia y energía no aprovechable o degradada.

* La energía es utilizada por todos los seres vivos principalmente para:

- 1ro.) **Biosíntesis** (trabajo químico), como se dijo en el ítem precedente.
- 2do.) **Contracción muscular o movimiento de flagelos** (trabajo mecánico).
- 3ro.) **Transporte a través de membranas** (trabajo osmótico).

* La **materia** que se requiere para la **biosíntesis** de estructuras proviene:

- a) En organismos heterótrofos (ver def.): de nutrientes del entorno (hidratos de C, lípidos y proteínas).
- b) En organismos autótrofos (ver def.): de CO_2 y H_2O y sustancias nitrogenadas del suelo que son productos de desecho de los heterótrofos.

* La **energía** requerida para la **biosíntesis** proviene:

- a) Organismos heterótrofos: De las reacciones de degradación (oxidación) de los nutrientes mencionados (hidratos de C, lípidos y proteínas).
- b) Organismos autótrofos: de la radiación solar.

* Los autótrofos (plantas y bacterias que **fotosintetizan**) y los heterótrofos (animales que **respiran**) viven en relativo equilibrio (ver ciclo del C), constituyendo la biosfera de nuestro planeta.

* **Toda la energía** utilizada por los seres vivos proviene en última instancia **del sol**, donde se origina por reacciones de fusión termonuclear en la que el **H** se convierte en **He**.

* Todas las **reacciones bioquímicas** que explican la síntesis de estructuras y degradación de nutrientes de los seres vivos (metabolismo) ocurren **espontáneamente** cumpliendo los principios de la TD (termodinámica), (ver def.), como cualquier reacción química.

* Las **reacciones químicas** ocurren por choques de moléculas, ruptura de enlaces atómicos y reacomodamiento de átomos en nuevos enlaces. Este proceso se dará espontáneamente a favor de **dos factores**: a) un **descenso de entalpía** (ver concepto de ΔH) o formación de enlaces más fuertes y estables en moléculas de menor contenido calórico y b) un **aumento de entropía** (ver concepto de ΔS) o mayor desorden del sistema.

* La espontaneidad de una reacción bioquímica (que ocurre a P y T constante) puede medirse por su variación de **energía libre** (ver concepto de ΔG) que contempla los factores mencionados, según la ecuación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ y que debe ser negativa (<0).

* Cuando una reacción termina (o sea, alcanza su **equilibrio** entre reactivos y productos), el $\Delta G = 0$.

* Las reacciones bioquímicas ocurren continuamente mientras el organismo está vivo, pues existe todo el tiempo un **desequilibrio** de concentraciones de metabolitos, o dicho de otro modo, se tiende a un equilibrio que nunca se alcanza a causa del ingreso de nuevos nutrientes o de la movilización de reservas. (Recordar modelo hidrodinámico de líquidos que caen a través de varios recipientes). Lo que sí suele lograrse, en (individuos sanos y adultos), es un **estado estacionario** (ver def.), el cual se logra por ajustados mecanismos de regulación que constituyen la llamada **homeostasis** (ver def.).

* Cuando los seres vivos **se organizan** (crean y ordenan sus propias estructuras) su **entropía desciende** ($\Delta S < 0$), pero, siendo sistemas abiertos, durante el proceso se desordena el entorno ($\Delta S > 0$), por lo cual se cumple el 2do. principio de la TD que exige que el ΔS del universo = ΔS del sistema + ΔS del entorno sea positivo.

* Para poder caracterizar qué tan “fácil” o “difícil” ocurre una reacción bioquímica podemos utilizar su **K_{eq}** (constante de equilibrio) o, lo que es equivalente, su ΔG° (ver def. y relaciones). $\Delta G^\circ = -2,3 RT \log K_{eq}$

* Las reacciones con $\Delta G^\circ < 0$ son **exergónicas o termodinámicamente favorables** y tienen su **K_{eq} > 1** (distinguir de reacciones exotérmicas con $\Delta H < 0$).

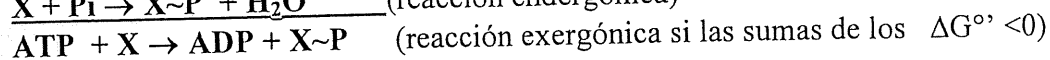
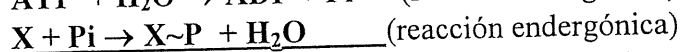
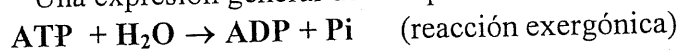
* Cuando una reacción bioquímica es desfavorable o endergónica, la célula viva consigue que, de todas maneras ocurra espontáneamente **acoplándole** una reacción fuertemente exergónica. De esa forma, el producto de la primera reacción es utilizado rápidamente como sustrato (reactivo) de la segunda, con lo que desciende su concentración. (ver como afecta a la ecuación $\Delta G' = \Delta G^\circ + 2,3 RT \log P/R$). Estas reacciones acopladas pueden darse en dos pasos sucesivos o simultáneos (ver ejemplos).

* Reacciones bioquímicas típicamente exergónicas (aptas para acoplarse a las endergónicas) son las que liberan, por hidrólisis, un grupo fosfato (**Pi = fosfato inorgánico**) de alguna molécula ($X\sim P + H_2O \rightarrow X + Pi$ donde $\sim$ **representa un enlace de alta energía**)

* Las moléculas (**fosforiladas**) (o sea las que tienen unido el grupo **Pi** ó **P**) se consideran **energizadas** y pueden ser capaces de transferir el grupo **P** y la energía de unión de ese grupo ($\sim P$) a otra molécula.

* El ATP (adenosin-tri-fosfato) es una molécula universalmente utilizada por los seres vivos como moneda de intercambio energético (ver esquema de potencial del grupo fosfato y ejemplos de reacciones).

* Una expresión general de la capacidad fosforilante del ATP puede escribirse:



BIOENERGÉTICA: CUESTIONARIO

1) Qué principio termodinámico permite explicar la transformación de **energía mecánica en energía calórica**? ¿Cómo se expresa matemáticamente ese principio cuando se produce un intercambio entre un sistema y su entorno? ¿Con qué valores y en qué unidades se expresa la equivalencia de las formas de energía mencionadas?

Indique el significado de sistema "abierto", "cerrado" y "aislado". ¿En qué clase de sistema ubicaría a los seres vivos (plantas o animales)? Justifique su respuesta.

2) ¿Cuál es el origen o de qué depende la energía química de una sustancia? ¿Cómo se la puede medir? Relacione este concepto con el **contenido calórico** de un alimento. Defina **variación de entalpía** y relaciónelo con el concepto de exotermicidad o endotermicidad de una reacción química.

3) Defina el concepto de biomasa. Ejemplifique la utilización de energía a partir de biomasa.

4) Enuncie el **segundo principio de la termodinámica**. Explique el significado de "**entropía**", e indique cómo influye este principio y el primer principio de la termodinámica en la espontaneidad de una reacción química. Relacione este concepto con el de **energía libre de una reacción**. Escriba la expresión matemática hallada por Gibbs para medirla.

5) Defina **variación de energía libre estándar** y relacione este concepto con la constante de equilibrio de una reacción bioquímica. Explique la diferencia entre un proceso endergónico y otro exergónico.

6) ¿Cuál es el origen de la energía química que porta el ATP? ¿Con qué reacción se mide su capacidad energética? ¿Cómo se transfiere su energía a otra molécula orgánica? (**Potencial de transferencia del grupo fosfato**). En relación a esto último dé un ejemplo de **reacciones acopladas** y explique qué función biológica tienen éstas en el transcurso de una vía metabólica.

7) ¿Cuál es el destino (o qué utilización general tiene) el ATP que sintetizan los seres vivos?

8) Discuta la relación entre los conceptos de organización, información y entropía. Interprete el concepto de **sistema antientrópico**. Aplíquelo a los seres vivos.

9) ¿Cuál es la fuente de energía que mantiene el equilibrio de autótrofos y heterótrofos en la biosfera? ¿Por cuánto tiempo puede asegurarse ese equilibrio? Explique el concepto de **muerte térmica del universo**.

10) Los ecologistas, defensores de la salud del planeta, promueven el reciclaje de todos los desperdicios de la actividad humana a fin de mantener en equilibrio el ecosistema. La aplicación de estos principios a la agricultura y ganadería se promocionan como "sistemas autosustentables". Discuta, teniendo en cuenta los principios de la termodinámica, si el reciclaje de desperdicios puede sostenerse hasta alcanzar un equilibrio absoluto e indefinido en el tiempo.

TEMA 2: ENZIMAS

ESQUEMAS

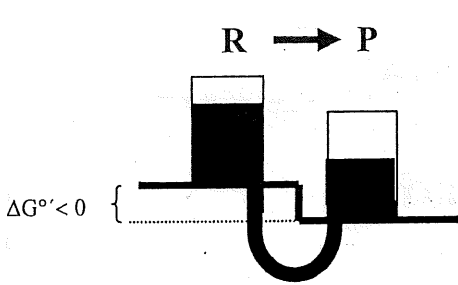
CONTENIDOS

- ENZIMAS
- CINETICA QUIMICA
- ACCION DE LAS ENZIMAS Y MODELOS
- CINETICA ENZIMATICA - MICHAELIS - MENTEN
- INHIBICION
- ENZIMAS REGULADORAS
- COENZIMAS

CLASIFICACION DE ENZIMAS

Nº	CLASE	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones
2	Transferasas	Transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Hidrólisis
4	Liasas	Adición a dobles enlaces o inversa
5	Isomerasas	Transf. de grupos dentro de la moléc.
6	Ligasas	Formación de C-C, C-S, C-O, C-N

CINETICA QUIMICA

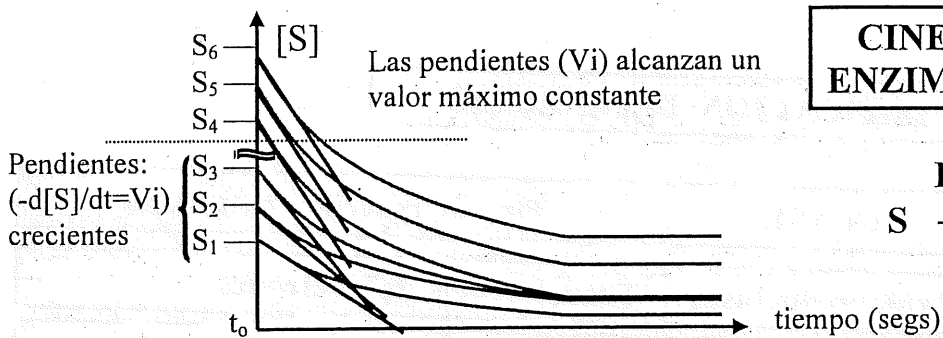
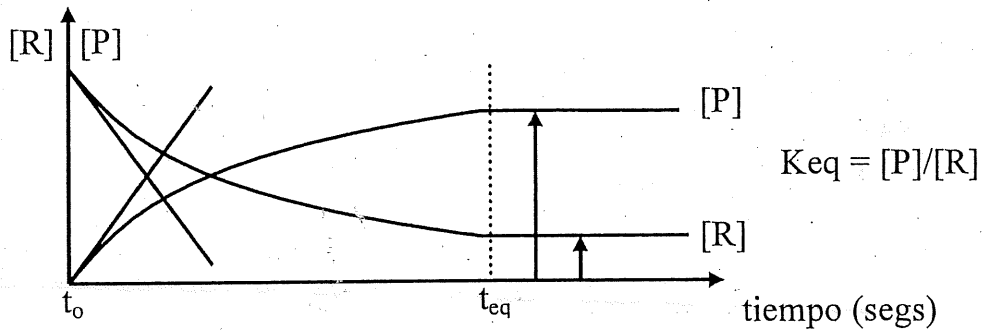


Velocidad de una reacción química

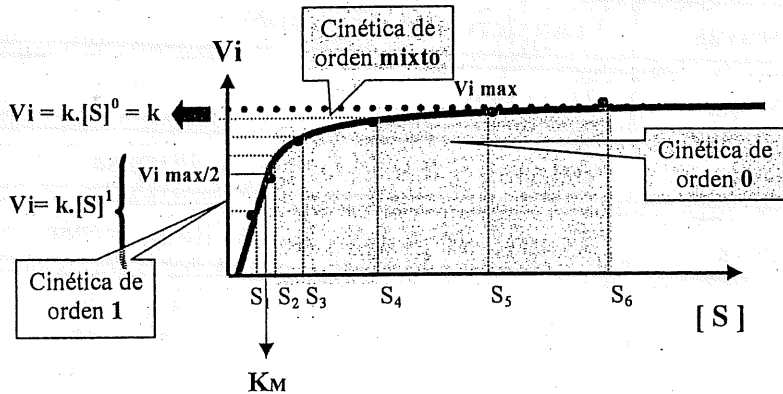
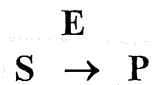
$$V_{R \rightarrow P} = \Delta[P] / \Delta t = -\Delta[R] / \Delta t$$

En el instante inicial (t_0) vale:

$$V_i = d[P]/dt = -d[R]/dt$$

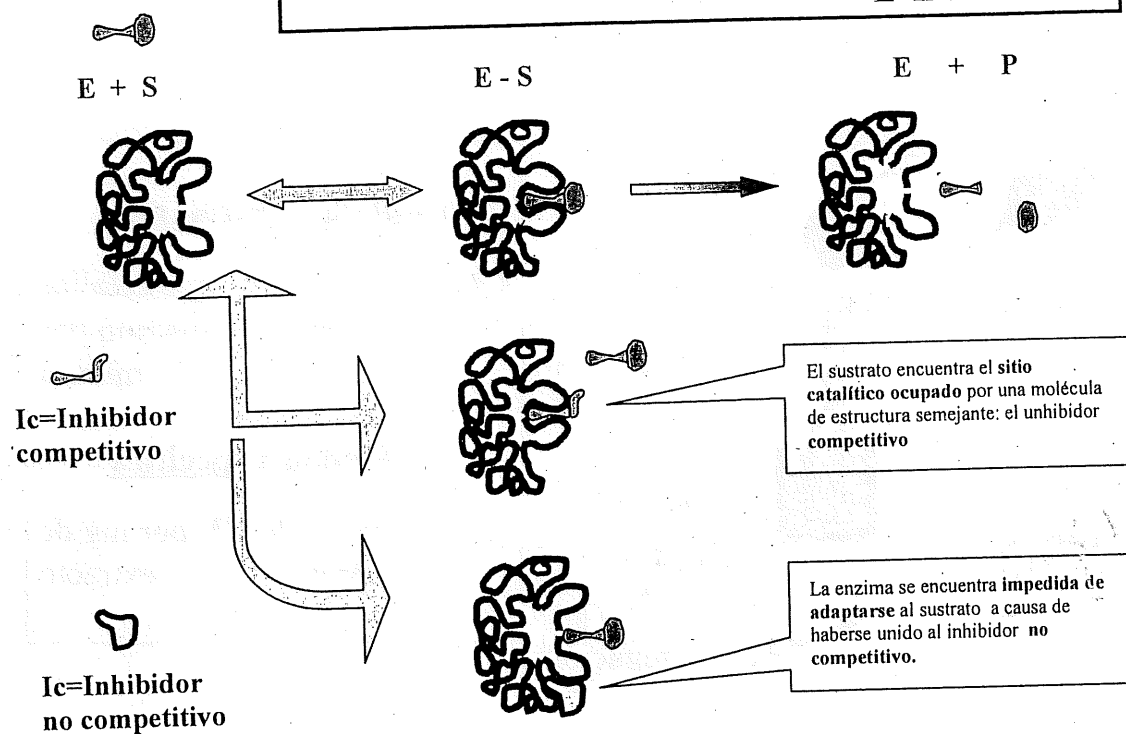


CINETICA ENZIMATICA



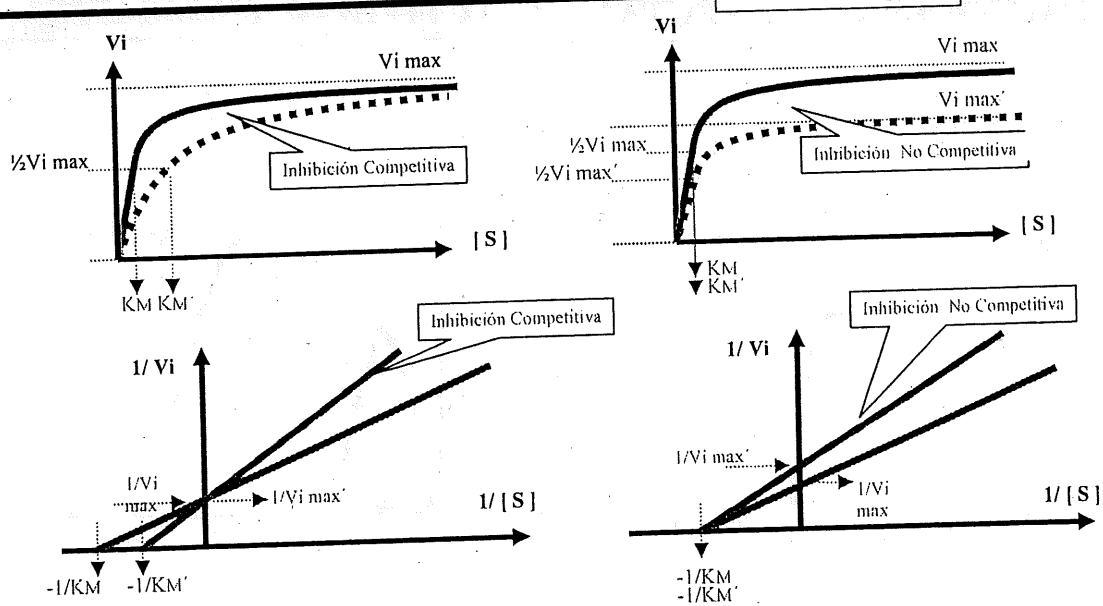
Michaelis supone:
 $S + E \leftrightarrow E-S \rightarrow P + E$
llegando a:
$$V_i = \frac{V_i \max \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

ENZIMAS: MODELO DE ADAPTACION INDUCIDA E INHIBICIÓN



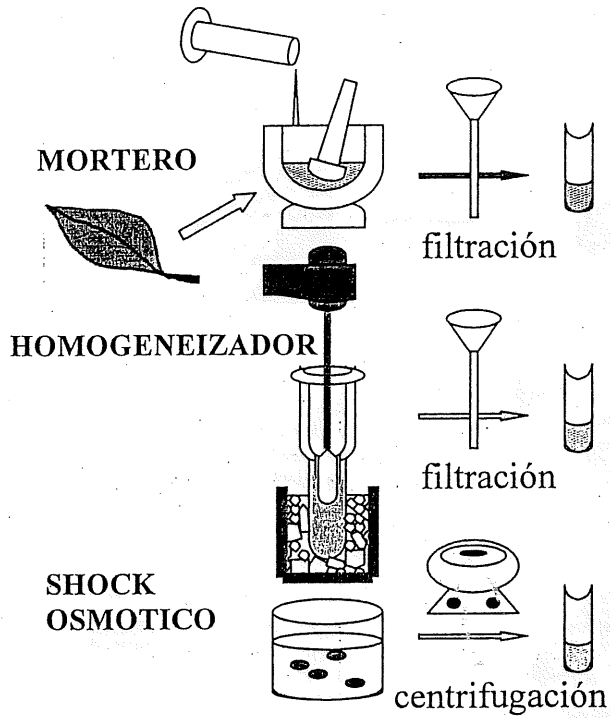
CINETICA de MICHAELIS-MENTEN

$$V_i = \frac{V_{i \max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$



ECUACION DE LAS INVERSAS: $1/V_i = K_M/V_{i \max} \cdot 1/[S] + 1/V_{i \max}$

EXTRACCION ENZIMATICA



Unidades Enzimáticas

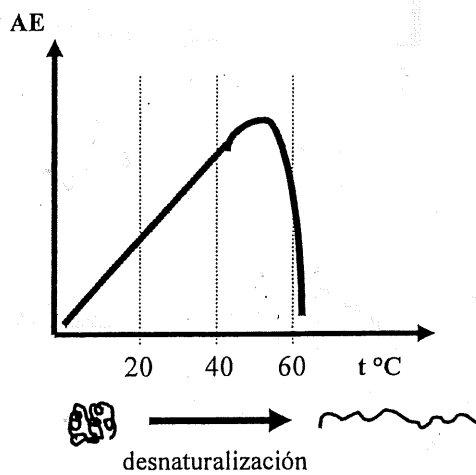
1 UE :cant. de enz. que cataliza
un μmol de sustrato por
minuto

Actividad Específica

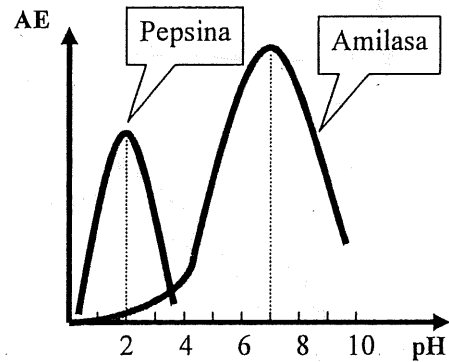
AE: núm. de UE por mg de
proteína en el extracto

FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

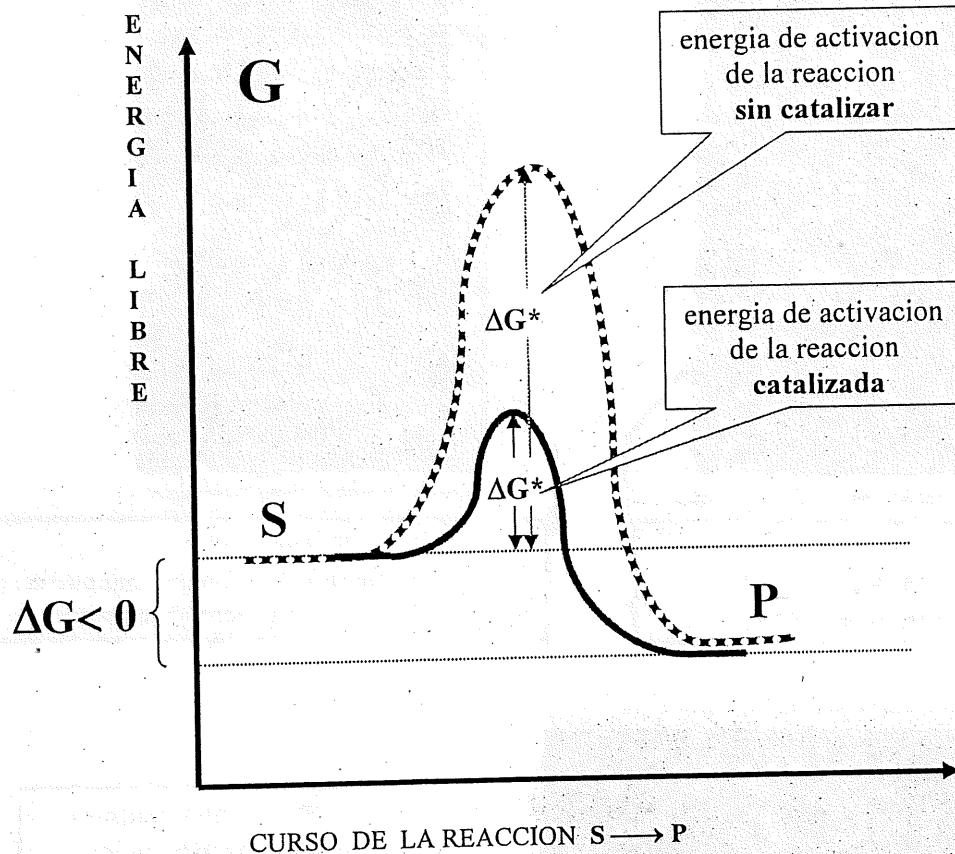
TEMPERATURA



pH



TERMODINAMICA DE LA CATALISIS ENZIMATICA



VITAMINAS Y COENZIMAS

Vitamina	CoEnzima	Grupo Transferido
B ₁ Tiamina	PPT	Aldehido --CH=O
B ₆ Piridoxina	Piridoxal-P	Aminos --NH ₂
B ₁₂ Cobalamina	CoE de Cob.	Alquilos --R
Pantotenato	HSCoA	Acilos --RC=O
H Biotina o B ₇	BiotCarboxil	Dióxido de C CO ₂
Folato	THF	Metil/metileno -CH ₃ --CH ₂ --
B ₂ Riboflavina	FAD FMN	Átomos de H y electrones H: H ⁺ + 2:e ⁻
Niacina PP	NAD ⁺ NADP ⁺	
	CoQ	

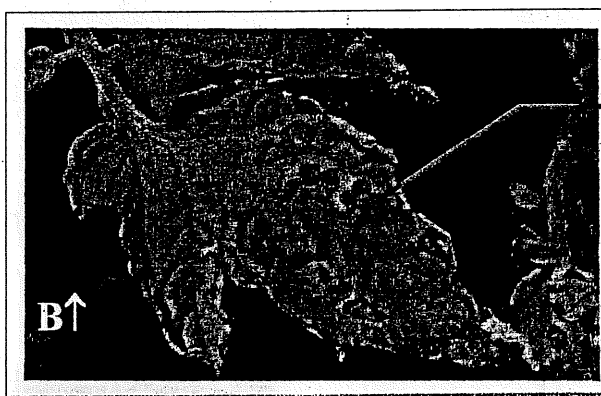
DEFICIENCIA DE COFACTORES METALICOS EN TOMATE



Deficiencia de Potasio causa **clorosis** entre nervaduras de hojas aunque éstas permanecen verdes



Deficiencia de Hierro produce **amarillamiento** de las hojas, aunque la red de finas nervaduras permanece verde



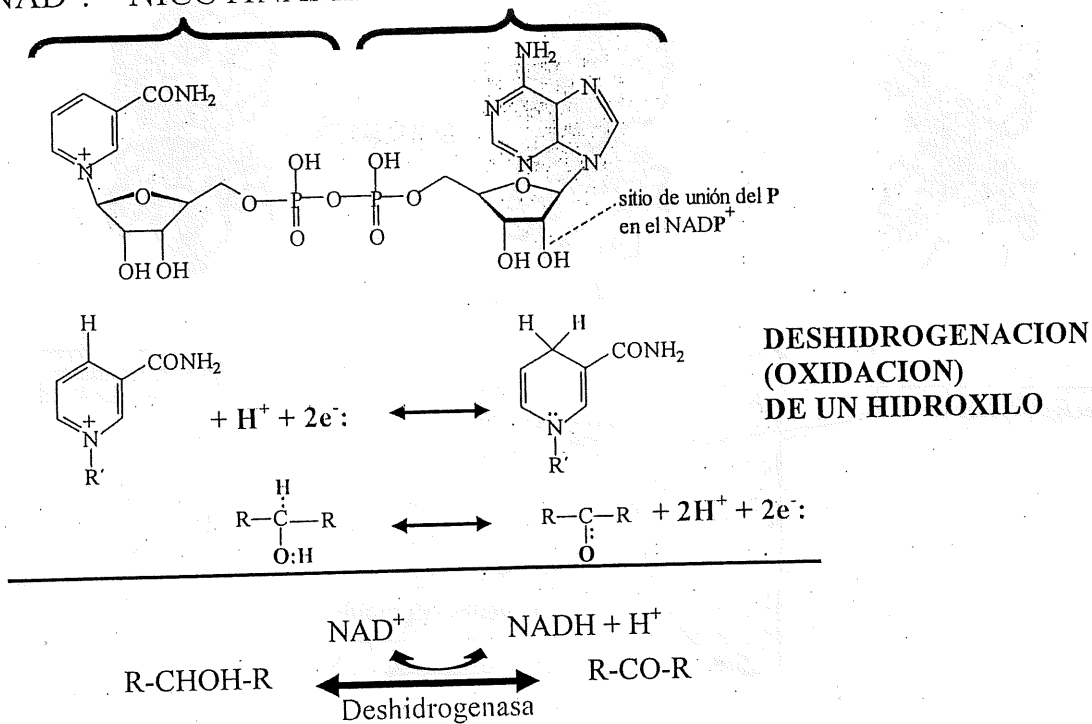
Exceso de Boro puede causar una **coloración oscura** en los bordes de las hojas y entre nervaduras. Los síntomas aparecen primero en las hojas más viejas.



Brotes deficientes en Fósforo presentan **hojas púrpuras**.

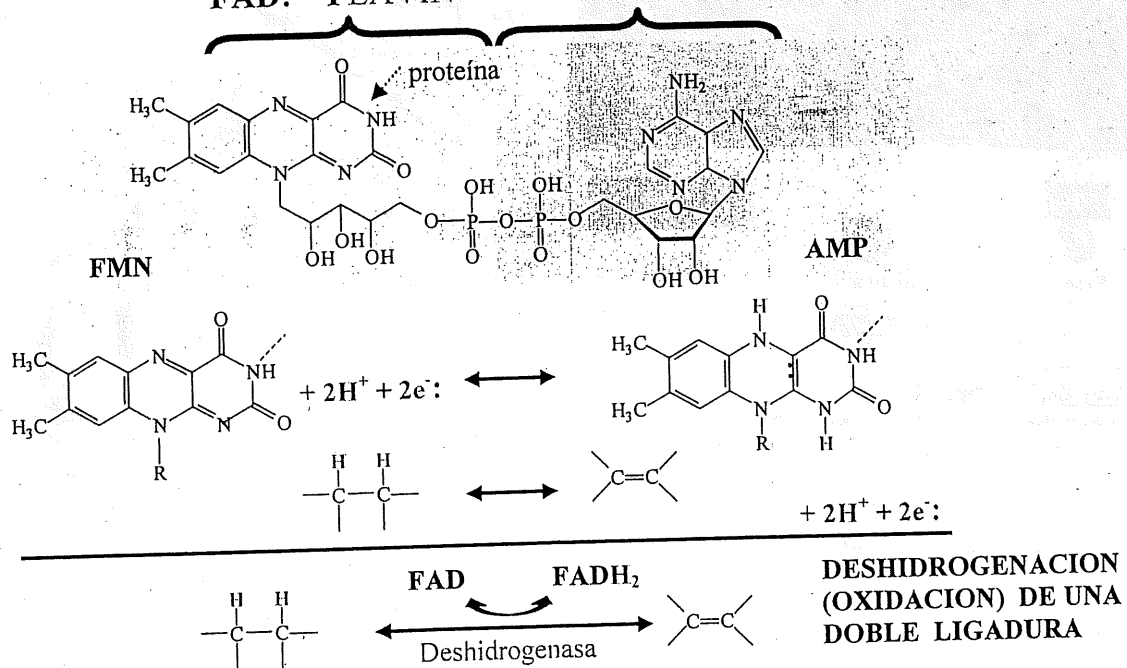
COENZIMAS: ACCION DEL NAD⁺

NAD⁺: NICOTINAMIDA - ADENIN - DINUCLEOTIDO

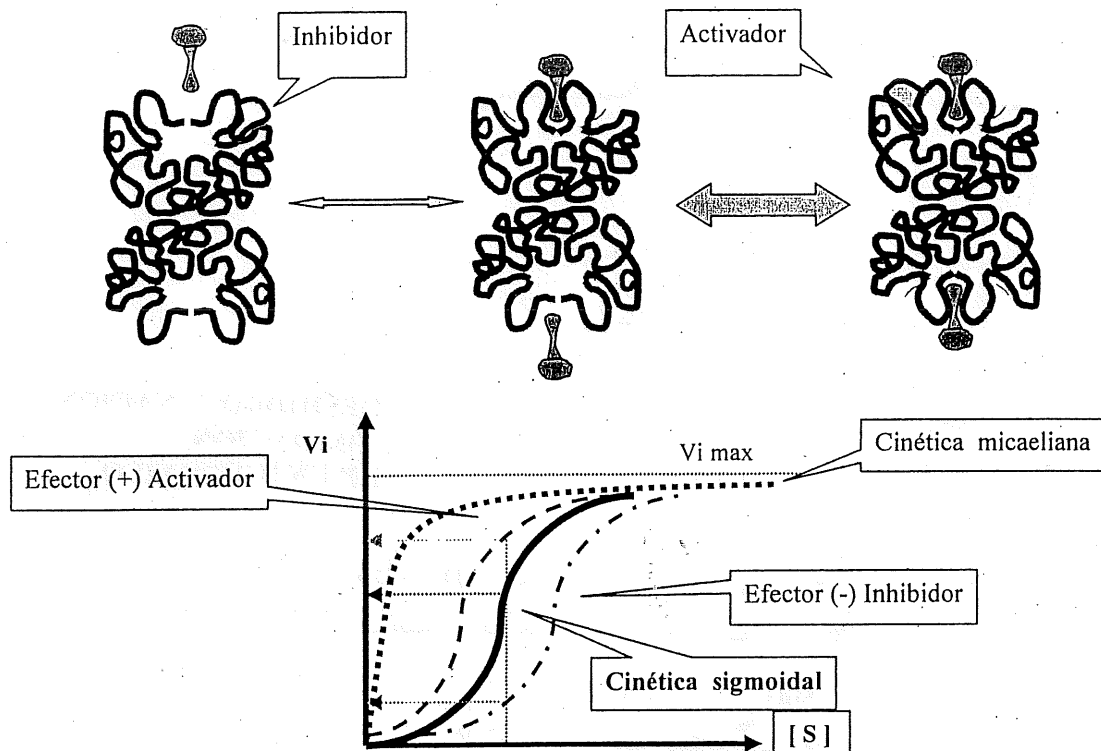


COENZIMAS : ACCION DEL FAD

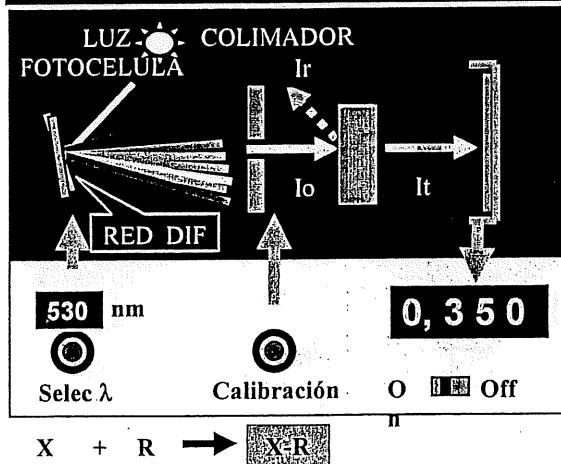
FAD: FLAVIN - ADENIN - DINUCLEOTIDO



ENZIMAS ALOSTERICAS



ESPECTROFOTOMETRIA



Ley de Lambert-Beer

Absorbancia: $Abs = -\log I_t/I_o = a \cdot b \cdot C$

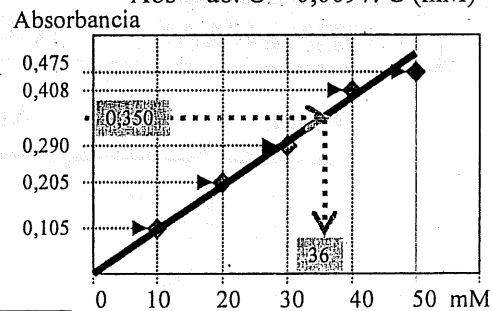
I_t/I_o = Int.de luz transmitida / incidente

a = coef. absorción molar [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$] o mM^{-1}

b = paso de luz = 1 cm

C = concentración molar M o mM

$Abs = ab \cdot C = 0,0097 \cdot C \text{ (mM)}$



Blanco

Tubo	0	1	2	3	4	5	M
R $\rightarrow$							
H ₂ O $\rightarrow$							
X $\rightarrow$							
Conc	0	10	20	30	40	50	36
Abs	,000	,105	,205	,290	,408	,475	,350

$Abs = ab \cdot C = 0,0097 \cdot C \text{ (mM)}$

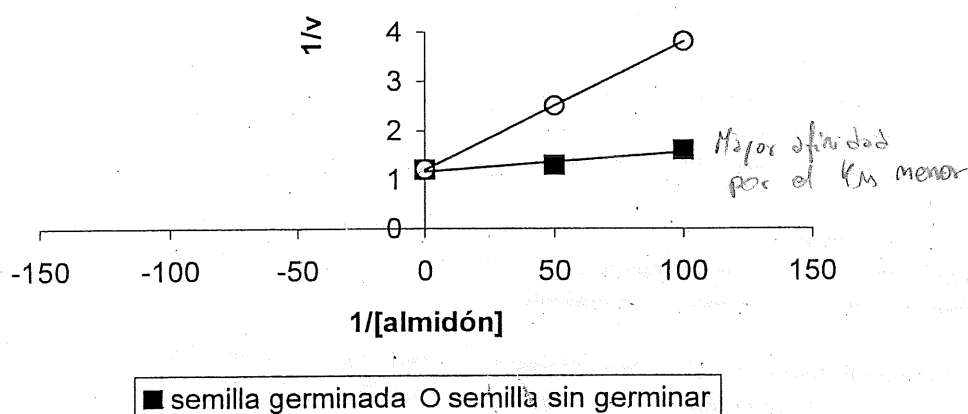
$$C = 0,350 / 0,0097 = 36 \text{ mM}$$

ENZIMAS (CUESTIONARIO)

- 1) Defina por su naturaleza química y función biológica el término enzima e indique:
- a) qué características generales son comunes a las enzimas y a los catalizadores no biológicos y abióticos;
 - b) qué propiedades particulares caracterizan a las enzimas.
- 2) ¿Qué es el sitio activo de una enzima?
- 3) Una reacción catalizada biológicamente puede suceder con variación positiva o negativa de la energía libre. Indique
- a) en qué caso esa reacción será espontánea, y qué fenómeno biológico debe acoplarse en caso que no lo sea.
 - b) qué es energía de activación (E_a) y cómo influye en la reacción descripta ($A \rightarrow P$).
 - c) qué efecto produce el agregado de una enzima sobre el valor de la energía de activación de una reacción. Fundamente.
- 4) Indique las características principales de la clasificación decimal de enzimas. Indique los seis grupos en que las enzimas se clasifican por la reacción que catalizan.
- 5) Explique qué son los cofactores de las enzimas. Clasifíquelos y ejemplifique.
- 6) Grafique la variación de la actividad enzimática en función de la concentración de enzima, el pH y la temperatura.
- 7) Dada la reacción: $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow P + E$
- a) Grafique la variación de la velocidad de reacción (velocidades iniciales) en función de la concentración de sustrato. Explique el comportamiento diferencial observado con altas y bajas $[S]$.
 - b) ¿Qué es velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) o límite y qué es la constante de Michaelis (K_m)?
 - c) Escriba la ecuación de Michaelis-Menten e indique en qué postulados y supuestos se fundamenta.
 - d) Explique qué relación se verifica entre el K_m y la afinidad aparente de una enzima por el sustrato.
 - e) Grafique $1/V = \_ (1/[S])$ (Lineweaver-Burk) señalando los parámetros cinéticos característicos. Indique la utilidad de esta representación respecto de la hipérbola o de Michaelis-Menten.
- 8) ¿Cómo actúan los inhibidores enzimáticos? Grafique $\{V = f[S] \text{ o } 1/V = f(1/[S])\}$ para una situación de inhibición competitiva y no competitiva. ¿Cómo interactúan S, E e I? En cada caso considere las gráficas con inhibidor y sin inhibidor. Fundamente las variaciones de $V_{\text{máx}}$ y/o K_m .
- 9) ¿Qué son las enzimas alostéricas? Ejemplifique.
- 10) Grafique $V = f([S])$ para un sistema catalizado por una enzima alostérica. Indique en la figura el efecto que se produce al agregar: a) un efector positivo; b) un efector negativo. Explique.
- 11) ¿Qué son las isoenzimas?

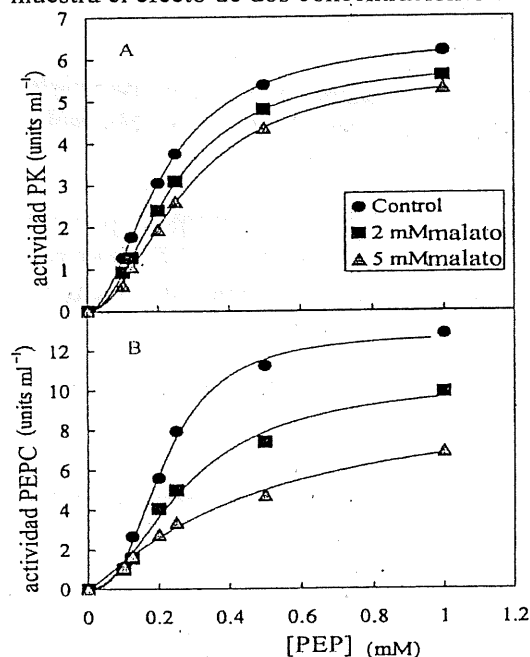
ENZIMAS (PROBLEMAS INTEGRADORES)

- 1) En semillas de cebada germinadas y sin germinar (maduras y viables) se realizó la extracción de la enzima beta-amilasa para estudiar sus propiedades cinéticas. Se obtuvo el siguiente gráfico de inversas:



- a) ¿Qué parámetros cinéticos son diferentes y cuáles no? $V_{max} \neq K_m$
 b) Calcule aproximadamente el valor de K_m para la enzima extraída de semillas germinadas.
 c) Explique la función de la beta-amilasa durante la germinación y mencione las diferencias con la alfa-amilasa.
 d) En base a los datos del gráfico cómo sería el mecanismo de regulación de la actividad de esta enzima.

- 2) A partir de nódulos de plantas de soja inoculadas con bacterias del género *Rhizobium*, se purificaron dos enzimas citosólicas: piruvato quinasa (PK) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Al analizar su cinética se obtuvieron los siguientes gráficos en los que además se muestra el efecto de dos concentraciones de malato.



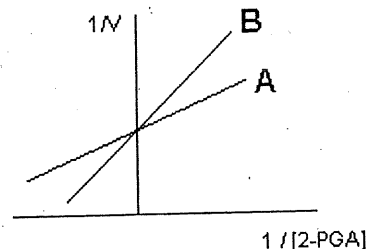
- a) Explique la función de cada una de estas enzimas en el metabolismo y formule las reacciones que catalizan.
 b) Considerando la forma de las curvas, indique qué tipo de enzimas son y cómo podría ser considerado al malato con respecto a ellas.
 c) El malato es una de las principales fuentes carbonadas para la asimilación del nitrógeno luego de la fijación. Partiendo de nitrógeno atmosférico y malato explique con un ejemplo cómo se llega a un aminoácido.
 d) La PEPC cumple una función primordial en la fotosíntesis de ciertas especies. Explíquela.

- 3) La actividad de la enzima enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidro-lasa) es rápidamente activada por anoxia (falta de oxígeno) en especies tolerantes a la inundación como *Echinochloa phyllopogon*. En cambio, en especies intolerantes a la anaerobiosis, inclusive del mismo

género, como *Echinochloa crus-galli* el aumento de la actividad de la enolasa sólo se produce después de 15 horas de provocada la anoxia.

a) En base a esta información grafique en un eje de coordenadas la actividad de enolasa en función del tiempo en plántulas de *E. phyllopogon* y en plántulas de *E. crus-pavonis* durante las primeras 15 horas de exposición a condiciones de anaerobiosis.

b) Fueron analizadas las propiedades catalíticas de enolasas purificadas provenientes de ambas especies. Los resultados se representaron según Lineweaver-Burk:



2-PGA= 2-fosfoglicerato

A: *E. phyllopogon*

B: *E. crus-pavonis*

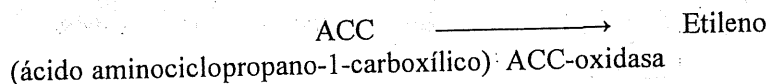
¿Qué información se puede obtener del gráfico mostrado?

c) Grafique en forma aproximada cómo sería la representación según Michaelis-Menten (velocidad en función de concentración del sustrato) para cada especie.

d) Explique cómo realizaría el experimento para llegar a los gráficos mostrados en b. ¿Qué mediría?

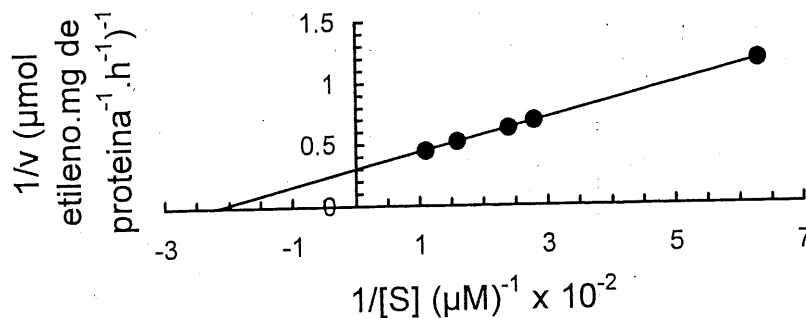
e) ¿Con qué se relacionaría la mayor tolerancia a la anaerobiosis de *E. phyllopogon*?

4) La ACC-oxidasa cataliza el último paso de la ruta de síntesis del etileno, una importante hormona vegetal, según la siguiente reacción:



Utilizando extractos de frutos de papaya (*Carica papaya*) un grupo de investigación determinó en 1998 la afinidad de la enzima ACC-oxidasa por el sustrato publicando el siguiente gráfico de dobles inversos (Lineweaver-Burk) para esta enzima.

Gráfico de Lineweaver-Burk para la ACC-oxidasa
utilizando ACC como sustrato



- a) Defina los parámetros cinéticos de una enzima según el modelo michaeliano y determínelos para la enzima ACC-oxidasa.
- b) Represente con aproximación el gráfico según Michaelis-Menten, considerando los datos obtenidos en el punto 1.
- c) El ditionito de sodio y el metabisulfito de sodio son poderosos agentes reductores consumidores de oxígeno. Al incorporarlos en la mezcla de reacción inhibieron la actividad de la enzima, según se observa en el siguiente cuadro.

<i>Inhibidor</i>	Concentración del inhibidor	Tasa de producción de etileno [$\mu\text{mol. mg proteína}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	
		Sin inhibidor	Con inhibidor
Ditionito de sodio	0.022 mM	5.45	0
Metabisulfito de sodio	0.021 mM	5.50	0

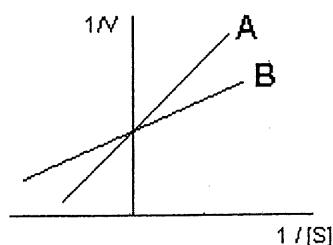
Clasifique la enzima según su clase y proponga un mecanismo de acción de estos inhibidores.

- d) El Co^{2+} desarrolla un tipo de inhibición no competitiva. Grafique sobre la representación de Lineweaver-Burk, cómo podría ser el gráfico en presencia del inhibidor, en comparación con el gráfico sin inhibidor. Comente cómo serán los respectivos parámetros cinéticos.
- 5) La penicilina es hidrolizada y con ello inactivada por la penicilinasas, una enzima presente en algunas bacterias resistentes. En un ensayo se midió la cantidad de penicilina hidrolizada por minuto, en una solución de 10 ml con 10^{-9} g de penicilinasas purificada, en función de la concentración de penicilina, obteniéndose los siguientes datos:

[PENICILINA]	Masa hidrolizada ($\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$)
$0,1 \times 10^{-5} \text{ M}$	$0,11 \times 10^{-9}$
$0,3 \times 10^{-5} \text{ M}$	$0,25 \times 10^{-9}$
$0,5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$0,34 \times 10^{-9}$
$1 \times 10^{-5} \text{ M}$	$0,45 \times 10^{-9}$
$3 \times 10^{-5} \text{ M}$	$0,58 \times 10^{-9}$
$5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$0,61 \times 10^{-9}$

- a) Represente $1/v$ en función de $1/[S]$ a partir de los datos de la tabla.
- b) Indique qué tipo de cinética tiene la penicilinasas.
- c) ¿Cuál es el valor de $v_{\text{máx}}$? ¿Y el de K_M ?
- d) ¿Qué valor tomará el K_M si en presencia de un inhibidor el nuevo valor de $1/v_{\text{máx}}$ es de $2,5 \times 10^9$? ¿De qué tipo de inhibición se trata? Justifique.

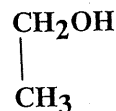
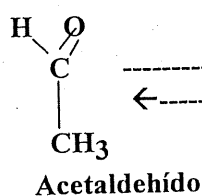
- 6) La sal glufosinato de amonio es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa, según se observa en el siguiente gráfico:



A: con glufosinato de amonio
B: sin glufosinato de amonio

- a) ¿Qué clase de inhibición ejerce el glufosinato de amonio sobre la glutamina sintetasa? Justifique en base a los parámetros observados en el gráfico.
 b) Represente el gráfico anterior en la forma hiperbólica o de Michaelis-Menten.
 c) Considere en el gráfico anterior V_i vs $[S]$ únicamente la curva sin presencia de inhibidor. Indique, graficando, cómo influiría en ella un aumento de cantidad de enzima.

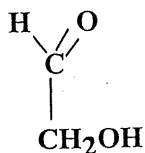
7) En 1992 se produjeron en nuestro país casos de intoxicación por adulteración de un medicamento (propóleo) con **etilenglicol**. La base de la toxicidad de este compuesto es que en el organismo se metaboliza a **ácido oxálico**, sustancia de alta toxicidad, teniendo como intermediario al **aldehído glicólico**. En el metabolismo de los hidratos de carbono, usted vio la siguiente reacción:



Fermentación
Alcohólica

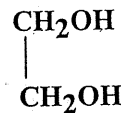
Etanol

La misma es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa y requiere coenzima reducida. Esta enzima puede también catalizar la siguiente reacción:



Aldehído glicólico

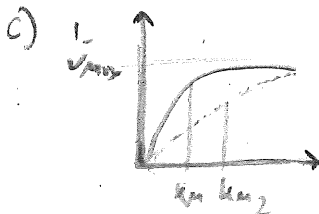
(intermediario del ácido oxálico)



Etilenglicol

Responda:

- a) ¿Por qué razón altas concentraciones de etilenglicol en los tejidos pueden originar toxicidad por oxálico? V_D > haber mucho ácido oxálico porque es reversible 1
 b) El tratamiento aconsejado consiste en suministrar altas cantidades de etanol. ¿Qué tipo de efecto produce el etanol sobre la metabolización del etilenglicol? Compete por la enzima 2
 c) Grafique (en un mismo gráfico) la velocidad de reacción de la alcohol deshidrogenasa en función de la concentración de etilenglicol, en presencia y en ausencia de etanol.
 d) Indique qué parámetros cinéticos son afectados en presencia de etanol y cuáles no. K_M
 e) Defina estos parámetros cinéticos.



ENZIMAS (TRABAJO PRÁCTICO EXPERIMENTAL)

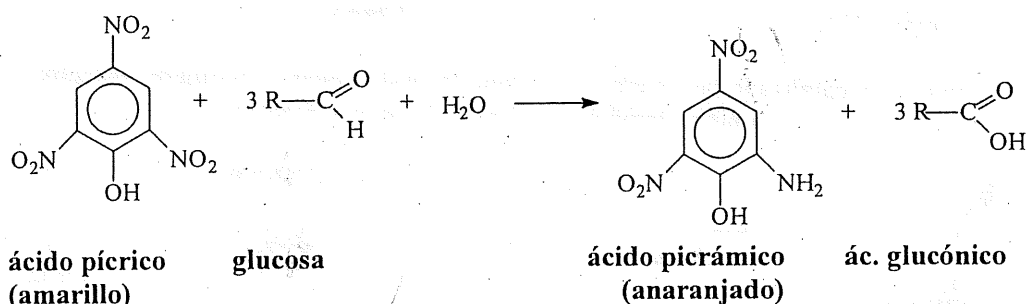
ESTUDIO CINÉTICO DE SACARASA

Introducción:

La sacarasa o invertasa es una hidrolasa que cataliza la hidrólisis de la sacarosa liberando glucosa y fructosa. Se encuentra en el lumen de las células epiteliales de las paredes intestinales, en levaduras y en células vegetales.

Los glúcidos liberados por la acción de esta enzima son capaces de reducir en medio alcalino al ácido pícrico (color amarillo) convirtiéndolo en ácido picrámico (color rojo). La intensidad de la coloración obtenida, medida espectrofotométricamente, es proporcional a la cantidad de glúcidos reductores presentes en la muestra.

Reacción simplificada:



Curva de calibración:

Para cuantificar la cantidad de glucosa presente en cualquier muestra a partir de la reacción con ácido pícrico, se requiere confeccionar previamente una curva de calibración que nos permita calcular el coeficiente de absorción del producto coloreado (ácido picrámico) formado a partir de la glucosa, según la reacción anterior.

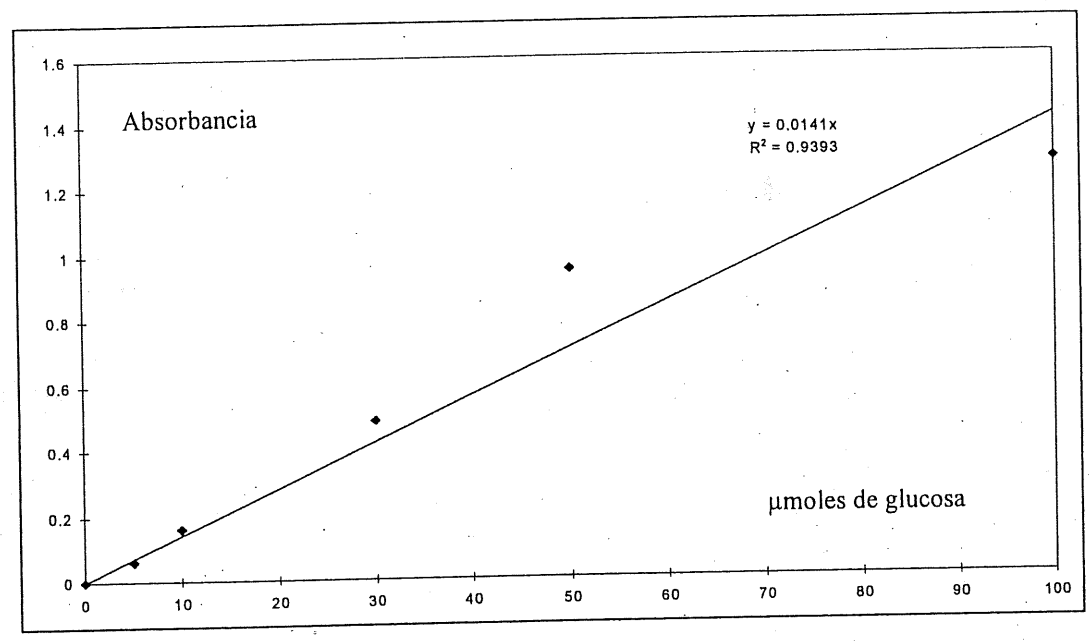
La curva de calibración se prepara de acuerdo al siguiente esquema:

Tubo N°	1	2	3	4	5	6
Solución glucosa 0,01M (ml)	0	0.5	1,0	3,0	5,0	10,0
Agua destilada (ml)	10	9.5	9,0	7,0	5,0	0,0
<i>Mezclar por agitación</i>						
Sol. de NaOH 10% P/V (ml)	1	1	1	1	1	1
Sol. de Ac.pícrico (ss). (ml)	2	2	2	2	2	2
<i>Mezclar por agitación y calentar en agua hirviendo 5 min.</i>						
Lectura de absorb. a 530 nm	0,000 *	0.060	0.157	0.486	0.947	1.271
µmoles glucosa/tubo	0	5	10	30	50	100

* Se calibra a cero el espectrofotómetro para que quede descontada automáticamente la absorbancia producida por la coloración del ácido pícrico.

$p/v = 100 g \cdot 1000 dm^3$

Como resultado de estas determinaciones experimentales se obtuvo la siguiente curva:
Gráfico N° 1. Absorbancia en función de concentración de glucosa (expresado en μ moles de glucosa por tubo)



y = absorbancia
x = concentración de glucosa

De esta recta se obtendrá el factor que permitirá calcular los μ moles de glucosa aparecidos por hidrólisis con sacarasa en el TP (Qué relación habrá entre dicho factor y la pendiente de la recta?).

Técnica para el estudio de la cinética de sacarasa

Se prepara un extracto enzimático a partir de una suspensión de levaduras (1g de levadura de cerveza en 100 mL de agua destilada) centrifugada durante 10 minutos a 3000 rpm.

Se procede según los siguientes pasos:

Número de tubo	1	2	3	4	5	6	7
Extracto enzimático (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solución de sacarosa 2 % p/v	0	0.5	1	3	5	7	9.5
Agua destilada (ml)	9.5	9	8.5	6.5	4.5	2.5	0
Mezclar por agitación e Incubar a 37°C durante 10 minutos							
Hidróxido de sodio al 10% p/v (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Solución de ác. pícrico concentrado (ss) (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Mezclar por agitación y calentar en agua hirviente durante 5 minutos							
Lectura de absorbancia a 530 nm	0.042	1.249	2.051	3.575	3.523	0.874	3.795
Conc. de sacarosa (mM= μ moles/mL)*	0	2.921	3.843	17.528	29.214	40.900	55.507
Concentración de glucosa (μ moles)	0	85.60	142.48	250.662	246.875	59.007	266.170
Velocidad de reacción (μ moles glu/min)							

10-6

Corta
13 mm

[P]
10

* Calcular la Molaridad en base a %p/v de sacarosa, el volumen utilizado y sabiendo que su masa molecular es
Mr: 342,3

En función de las concentraciones de sustrato (mmolaridad de sacarosa) y las velocidades de reacción (μ moles glu/min), graficar la curva de reacción e indicar los parámetros cinéticos: Velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten sobre la gráfica según

Michaelis-Menten y sobre la gráfica de las inversas de Lineweaver-Burk. (Utilizar papel milimetrado o realizar el gráfico en computadora).

TEMA 3 METABOLISMO-GLUCÓLISIS

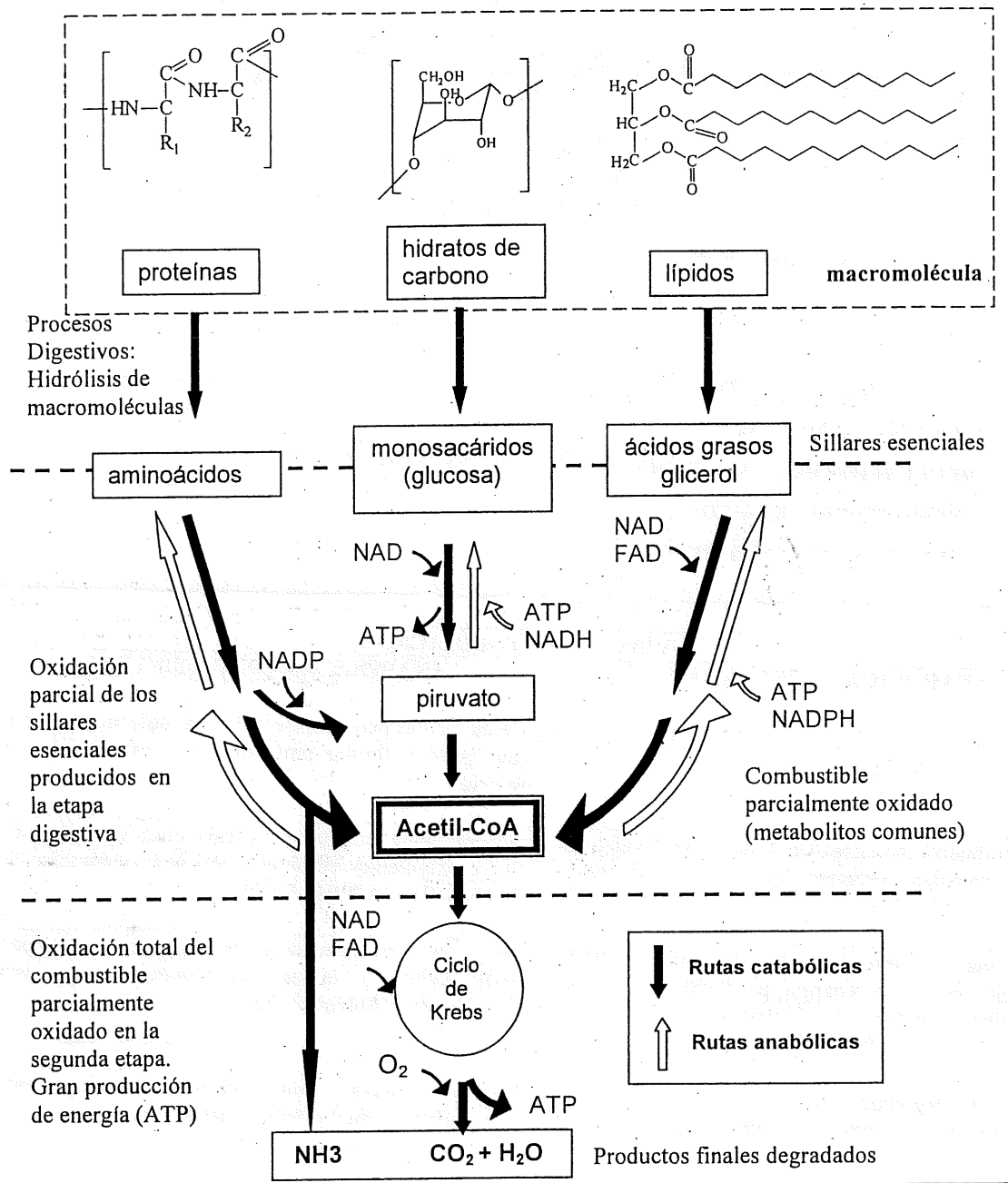
ESQUEMAS (*)

CONTENIDOS

- METABOLISMO SINÓPTICO
- REGULACIÓN DE VÍAS CATABÓLICAS Y ANABÓLICAS
- GLUCÓLISIS
- DESTINO DEL PIRUVATO
- TIPOS DE FERMENTACIÓN
- REGULACIÓN DE LA VÍA GLUCOLÍTICA (EFECTO PASTEUR)
- FERMENTACIÓN EN SILOS
- FERMENTACIÓN EN EL RUMEN

VÍAS METABÓLICAS	
CATABÓLICAS (DEGRADATIVAS)	ANABÓLICAS (DE BIOSÍNTESIS)
Partiendo de moléculas grandes se obtienen moléculas pequeñas.	De moléculas pequeñas se obtienen moléculas mayores (que pueden formar parte de tejido estructural o de reserva).
Generalmente comprenden reacciones oxidativas: Por consiguiente requieren coenzimas oxidantes del tipo NAD^+ , NADP^+ , FAD .	Generalmente comprenden reacciones de reducción. Por consiguiente requieren coenzimas reductoras del tipo NADH , NADPH , FADH_2 .
Sus vías comprenden, en general reacciones exergónicas y la energía producida por estas reacciones conduce a la formación de ATP a partir de ADP y Pi .	Sus vías comprenden, en general reacciones endergónicas y la energía requerida por estas proviene de la hidrólisis del ATP .
Desde la degradación de nutrientes esenciales se converge hacia metabolitos comunes.	Divergen desde metabolitos comunes hacia metabolitos de muy diferente naturaleza.

(*) Nota: Algunos de los esquemas utilizados en este teórico-práctico han sido extraídos del libro **"BIOENERGÉTICA-Introducción al estudio de la Bioquímica"**. Editorial Facultad Agronomía.2004. Gustavo D. Trincherro. Otros esquemas son de: **"Introducción al metabolismo del animal poligástrico"**. Editorial Facultad Agronomía.2003. Gustavo D. Trincherro y Laura N. Pintos.



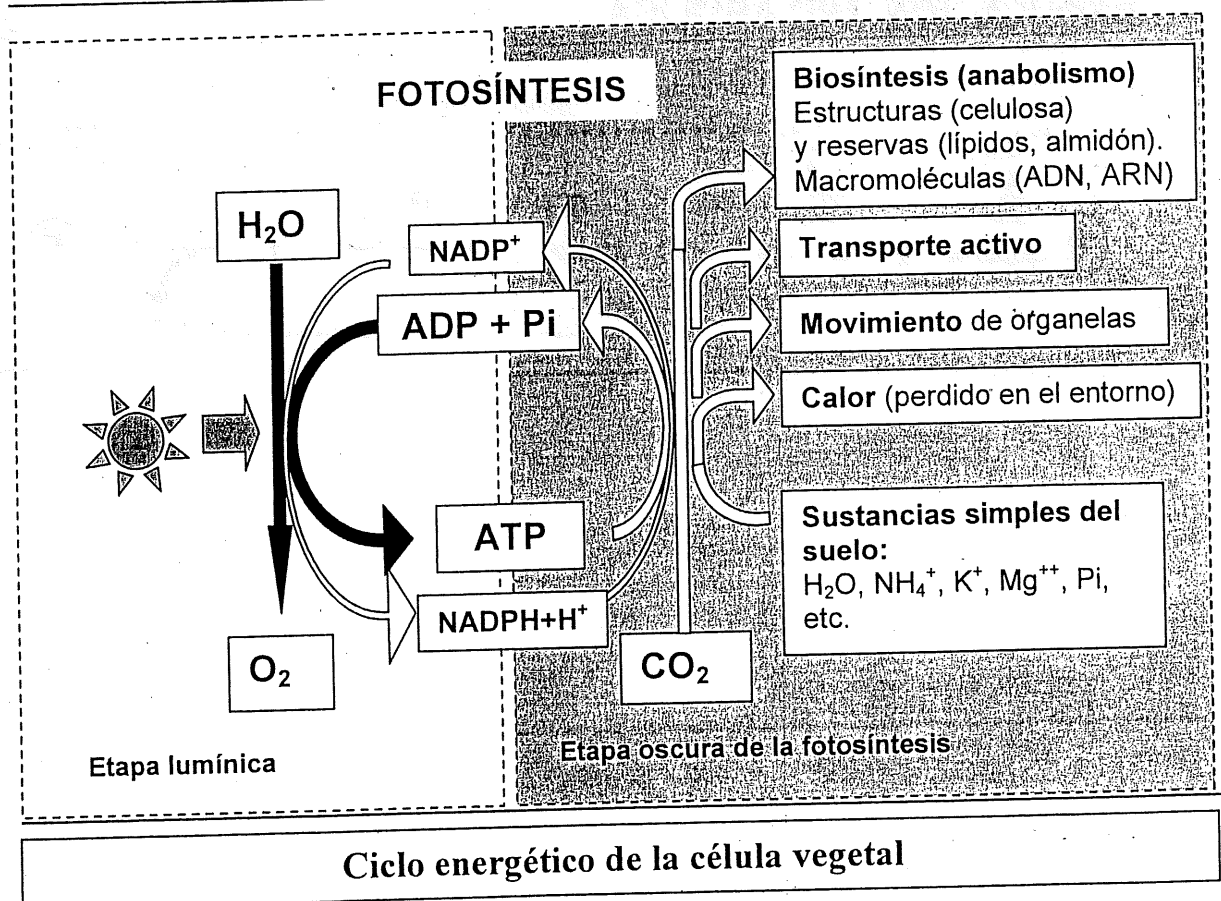
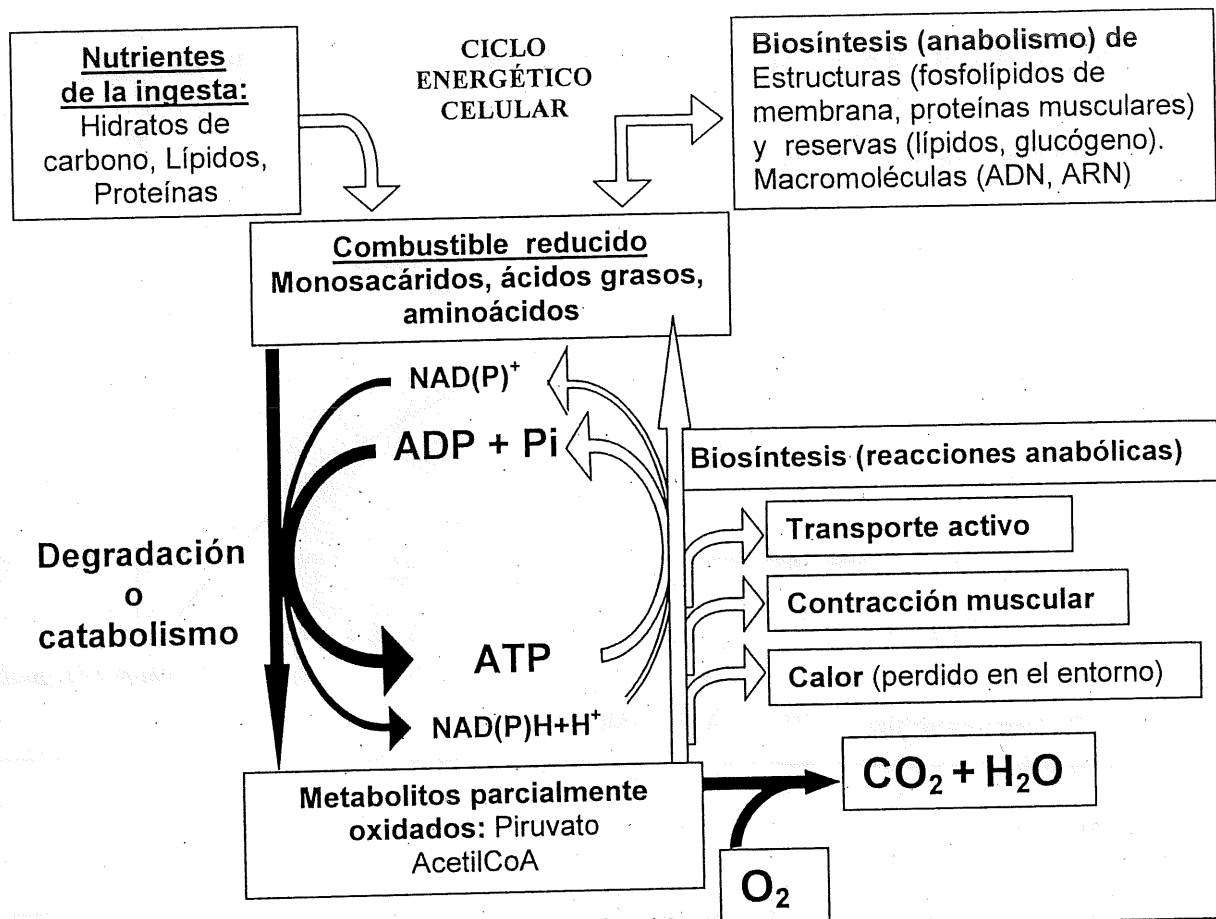
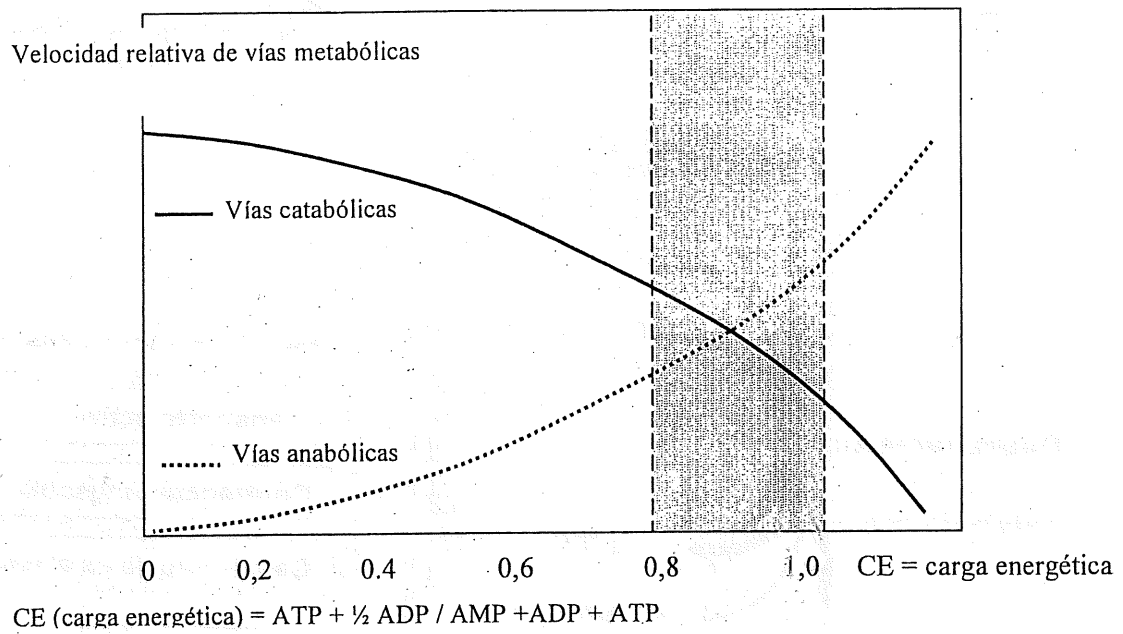
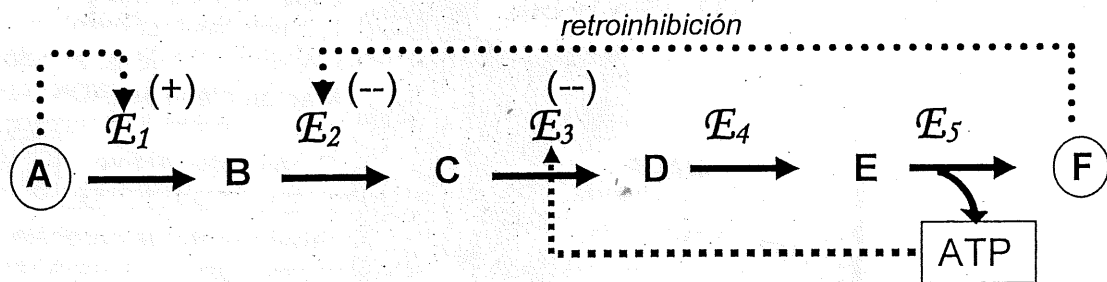
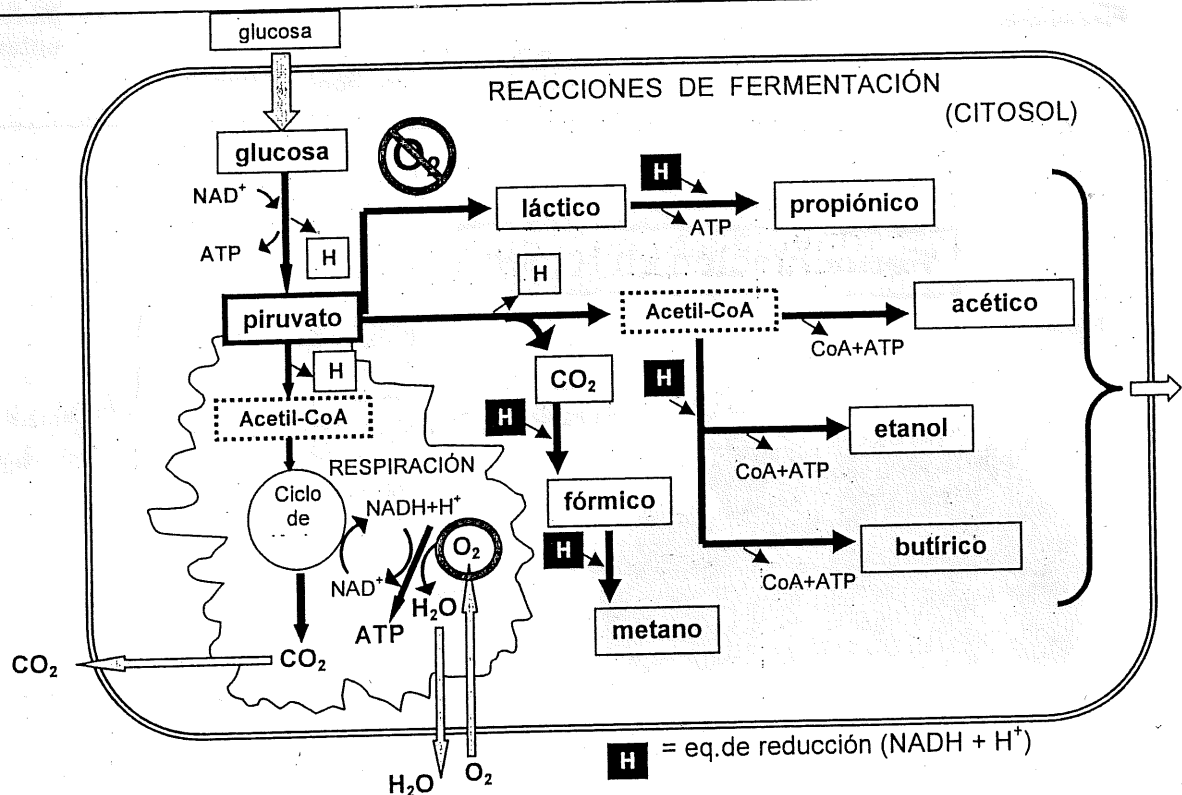
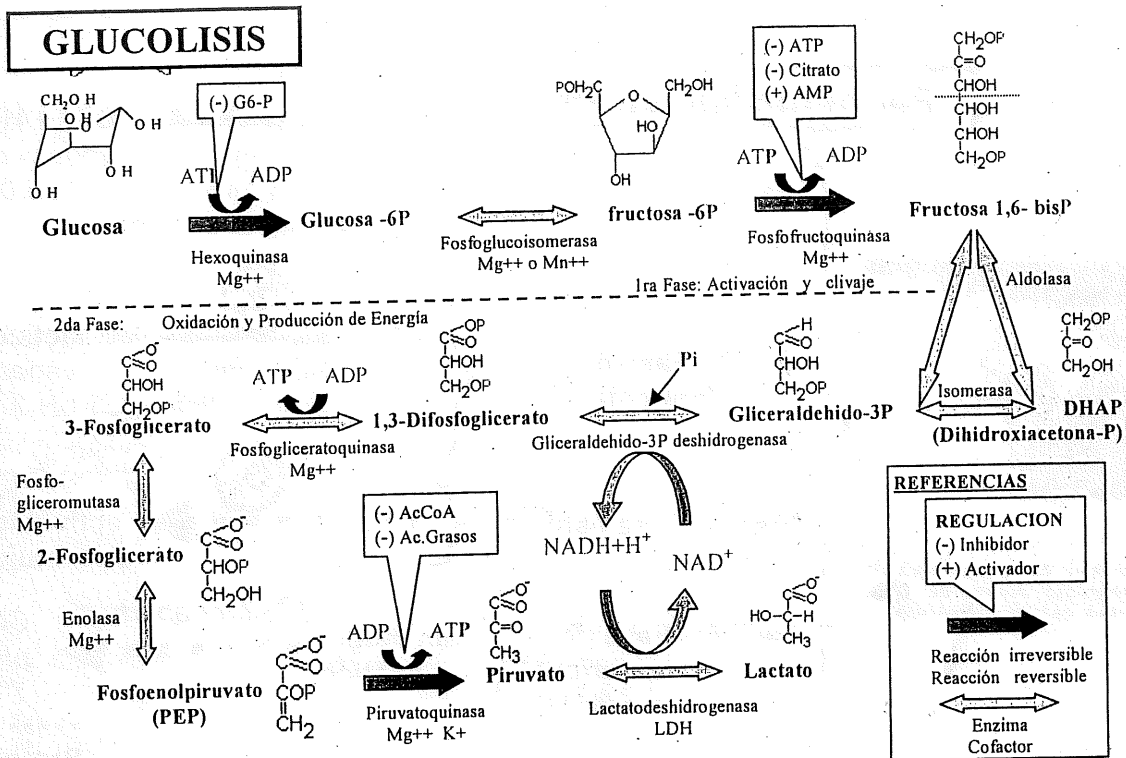


Diagrama de Atkinson: regulación de vías metabólicas por carga



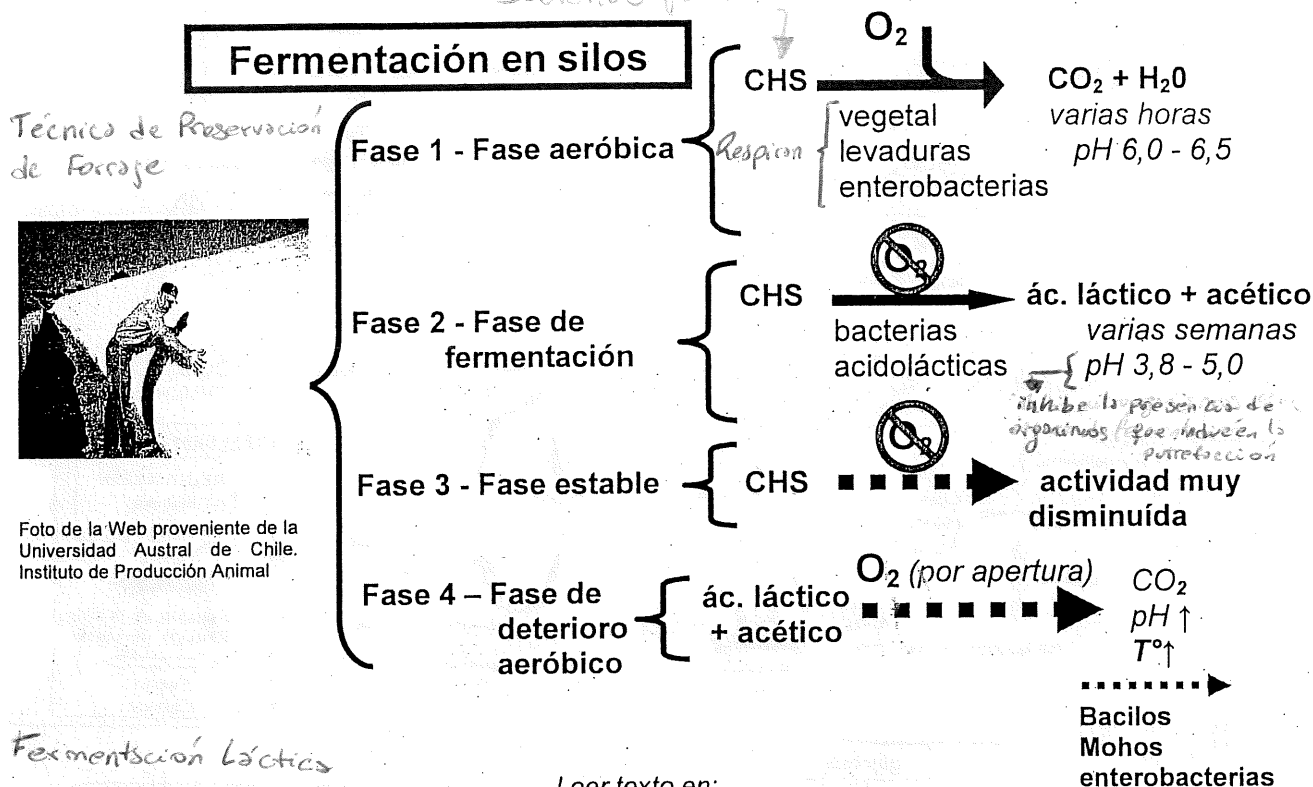
REGULACIÓN METABÓLICA



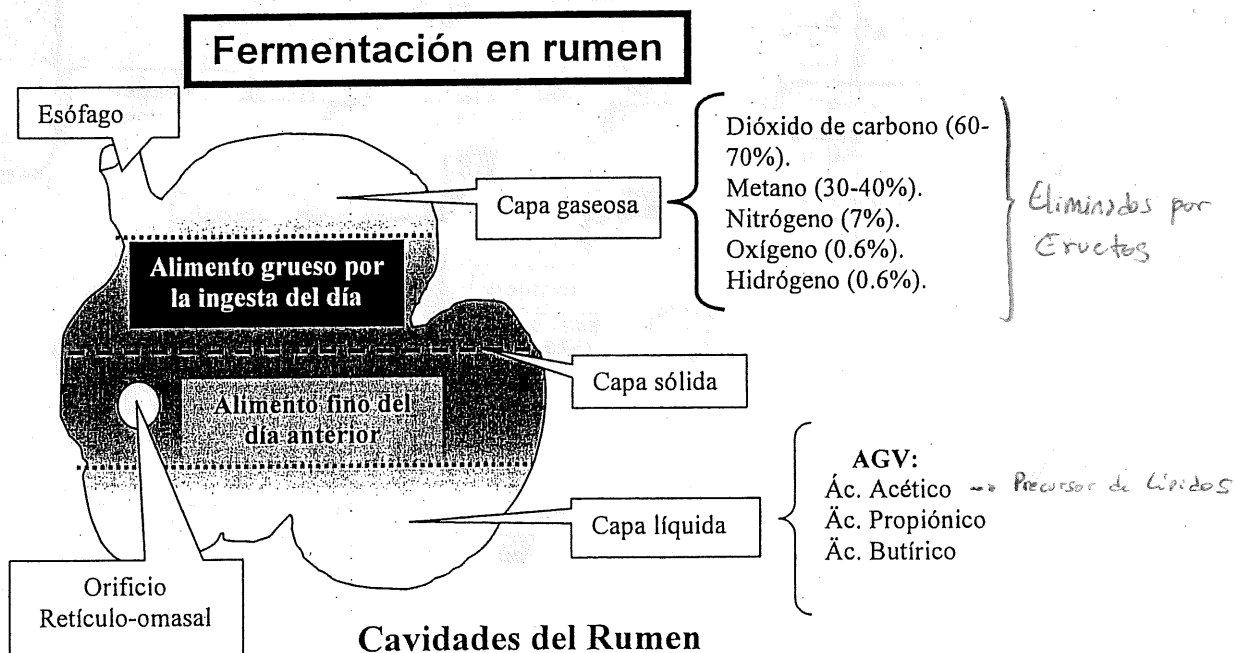


CHS = Carbohidratos Hidrosolubles

Bacterias fermentan

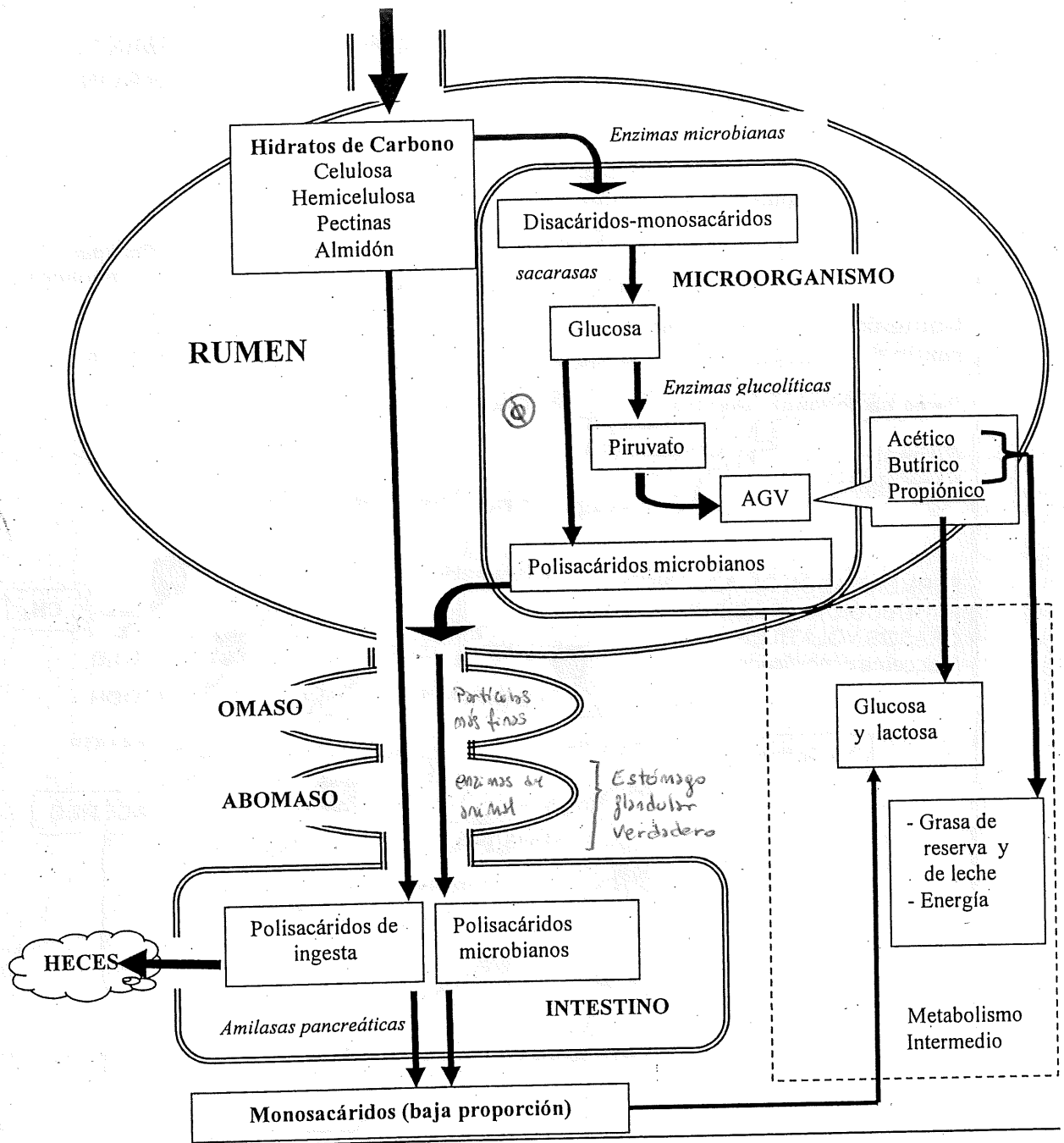


Fermentación Láctica



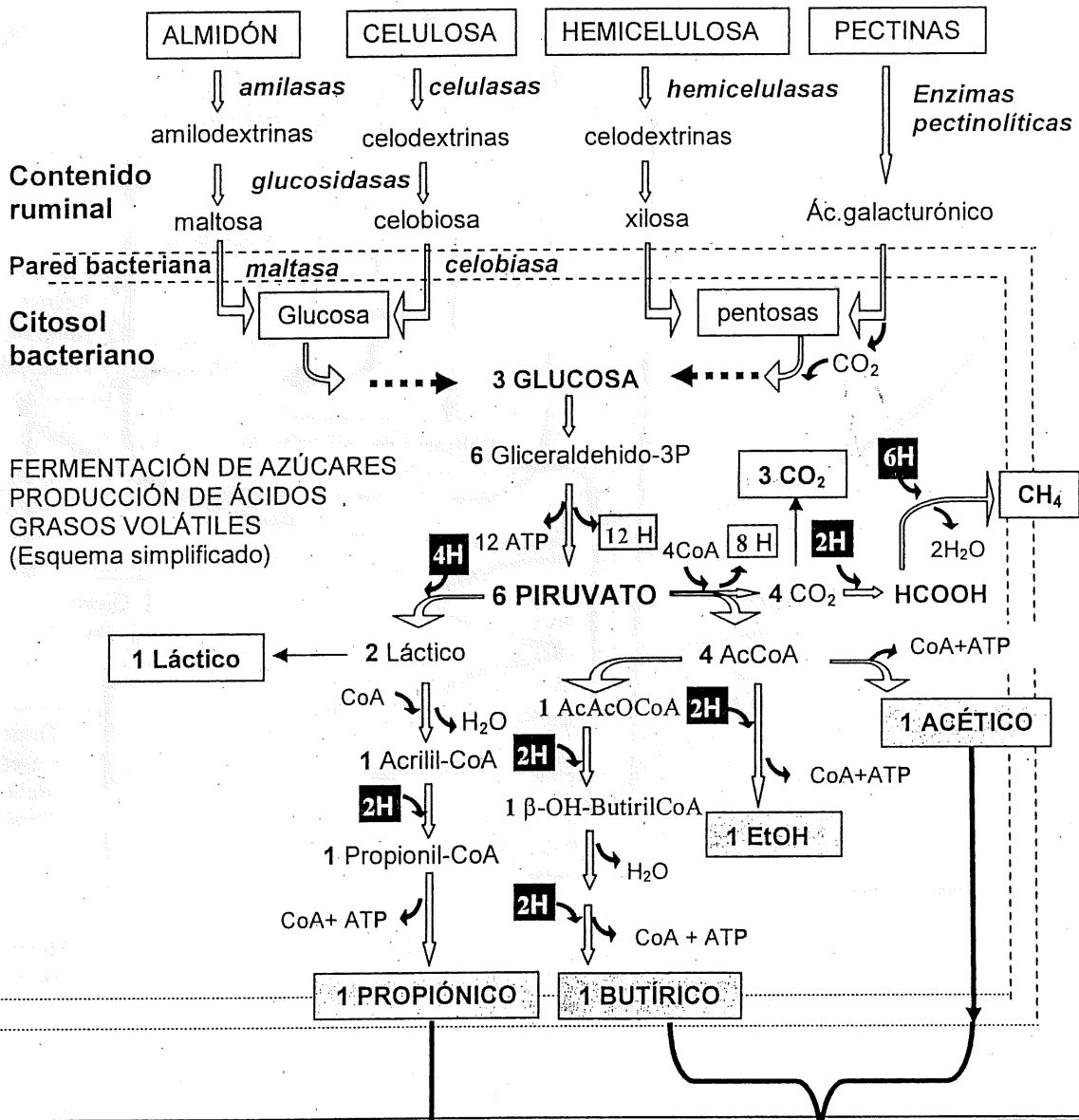
La fermentación acética genera poder reductor, usado en las otras fermentaciones.

Animales ruminantes (Poligástricos): no degradan Celulosa, Pectinas y Hemicelulosas por sí solos. Tienen una cavidad Reticulo-Antest con microorganismos, que se incorporan por la ingesta de pasturas. (no tienen enzimas).



FERMENTACIÓN RUMINAL DE HIDRATOS DE CARBONO

DEGRADACIÓN DE POLISACÁRIDOS
POR MICROORGANISMOS RUMINALES



Nota:

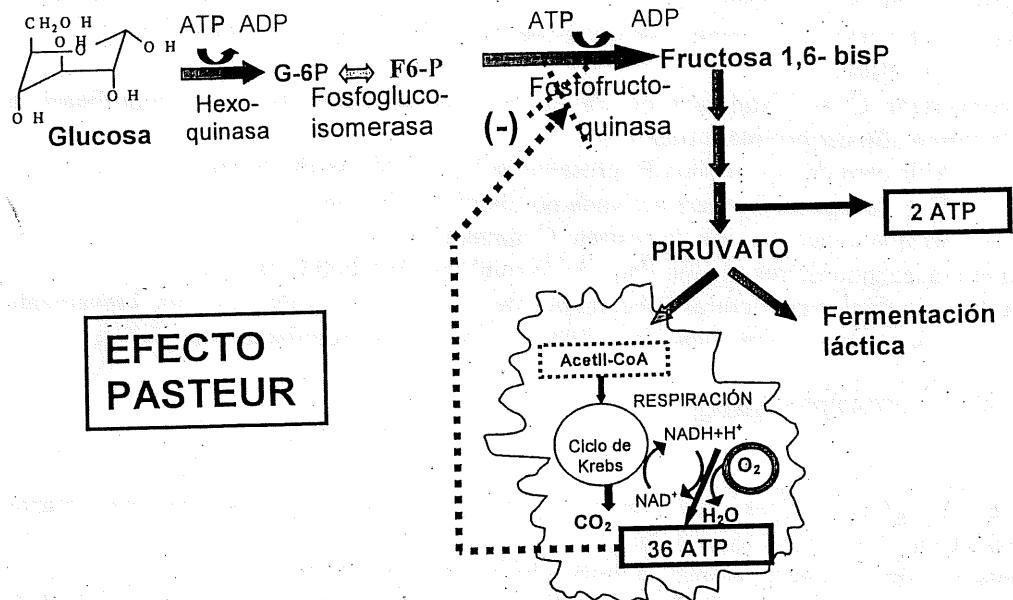
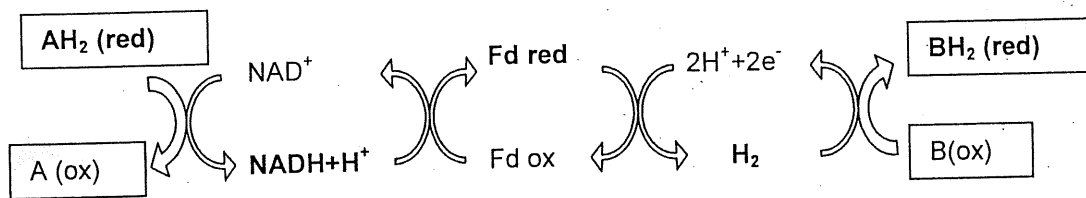
CoA= Coenzima A
Por economía de espacio en todos los esquemas se omite el grupo **sulfhidrilo (HS-)**
Así, CoA = HSCoA
y
acetil CoA= AcCoA= AcSCoA

- Glucosa
- Lactosa

- Grasa de reserva y de leche
- Energía

Metabolismo Intermedio

Transferencia del Poder Reductor



INTRODUCCIÓN AL METABOLISMO (CUESTIONARIO)

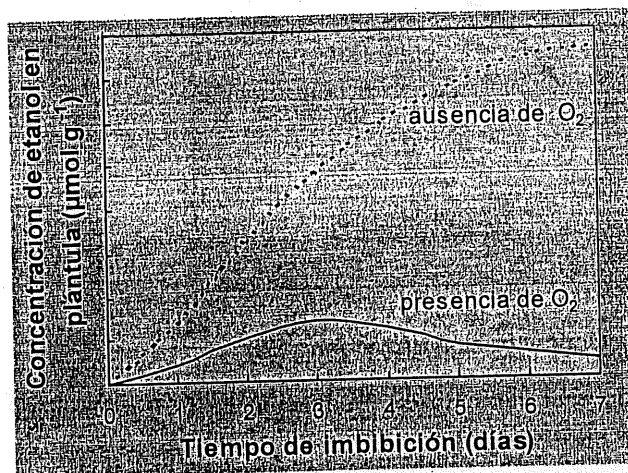
- 1) ¿Qué entiende por vía metabólica? Distinga las características de vías anabólicas y catabólicas.
- 2) Realice un esquema que muestre la convergencia de las vías catabólicas e indique la ventaja de esta estrategia.
- 2) Explique en qué condiciones celulares están activadas las vías anabólicas. Indique qué ocurre con las catabólicas en esas condiciones. Justifique sus respuestas.
- 3) Indique los destinos de la energía obtenida de la degradación metabólica de nutrientes en la célula de un organismo heterótrofo. Compárelos con lo que ocurre en una célula fotosintética.
- 3) En una dada secuencia de reacciones $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow F$, catalizadas por las enzimas E_1, E_2, E_3, E_4 y E_5 respectivamente, ¿de qué depende la velocidad de formación del producto F ? Justifique
- 4) Sea la conversión $C \rightarrow D$ catalizada por la E_3 , la etapa limitante. Como se modificará la velocidad de formación del producto final F si:
 - a) la cantidad de enzima E_3 presente en la reacción se duplique;
 - b) si la enzima E_3 fuera activada por un efector alostérico;
 - c) si la concentración de sustrato C aumenta.
- 5) Describa el mecanismo de regulación llamado retroinhibición (feed back).
- 6) Enumere las principales estructuras subcelulares de la célula eucarionte. Discuta brevemente la importancia de la compartimentalización celular en relación a la regulación metabólica.

GLUCÓLISIS (CUESTIONARIO)

- 1) ¿Qué es la glucólisis? ¿en qué organismos tiene lugar? ¿cuáles son sus etapas (describalas)? ¿Cuál es su ubicación celular?
- 2) Esquematice las reacciones que ocurren desde glucosa hasta piruvato.
- 3) ¿Escriba en detalle la etapa oxidativa de la glucólisis? ¿Qué es la fosforilación a nivel de sustrato (FNS)?
- 4) ¿Cuáles son los pasos irreversibles de la glucólisis? ¿Cuáles son sus enzimas y cómo están reguladas?
- 5) ¿Qué destinos metabólicos puede tener el producto final de la glucólisis y en qué condiciones ocurren?
- 6) ¿Cuántos moles de ATP rinde la oxidación de un mol de glucosa que ha seguido la vía glucolítica cuando ésta se oxida hasta piruvato y hasta CO_2 ?
- 7) Enuncie y explique el efecto Pasteur.
- 8) Escriba las ecuaciones correspondientes a las fermentaciones alcohólica y láctica a partir de piruvato. Indique el objetivo biológico de la reacción de fermentación
- 9) Describa las fases biológicas que sufre un material vegetal ensilado. ¿Qué tipo de fermentación es la deseable? Justifique.
- 10) ¿Cuáles son las principales fermentaciones ruminales?
- 11) Realice un cuadro en que se muestren las principales funciones o transformaciones que producen bacterias, hongos, levaduras y protozoarios en el rumen.
- 12) Explique la influencia de la alimentación en la proporción de AGV producidos en el rumen.
- 13) Indique los diferentes destinos de los AGV formados en el rumen.
- 14) Indique con ejemplos cómo las reacciones de fermentación producidas por distintos microorganismos contribuyen a mantener el equilibrio redox en el rumen.
- 15) De ejemplos de reacciones productoras de energía durante los procesos de fermentación ruminal y señale el destino de esa energía.

GLUCÓLISIS (PROBLEMAS INTEGRADORES)

1) En un experimento en que se utilizaron semillas de *Echinochloa crusgalli* (pata de gallo o pasto de agua), una maleza común en cultivos de arroz, se pudo determinar que en condiciones de **anaerobiosis** se producía un incremento en el contenido de etanol en la plántula, según el siguiente gráfico:

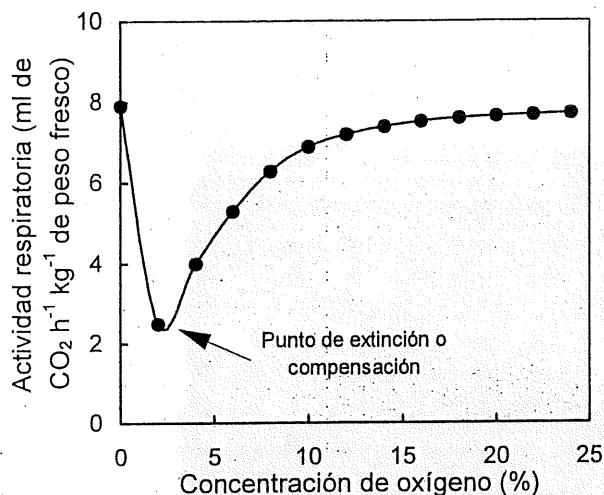


Indique:

- ¿Qué proceso bioquímico está ocurriendo, y cuál es el sentido biológico del mismo? *Fermentación Alcohólica*
- ¿Cuál es el sustrato inicial que se está degradando? *glucosa*
- ¿Qué compuesto rico energético se puede sintetizar a expensas de ese sustrato inicial? ¿Qué nombre recibe este tipo de reacciones y cuál es la definición de las mismas? *ATP*
Catabolismo
- Si desaparecieran las condiciones de anaerobiosis del suelo y la plántula quedara expuesta a E_0 más lenta *aerobiosis*, ¿qué sucedería probablemente con el ritmo de degradación del metabolito inicial?
- ¿Cuál sería la etapa metabólica sensible a este cambio? *Cadena Respiratoria*
- En condiciones de aerobiosis, ¿cuál podría ser el destino del etanol formado anteriormente? *Forma Acetil CoA*
Sugiera un posible mecanismo de metabolización del etanol producido.

2) Para extender la vida postcosecha de los frutos en cámaras de almacenamiento suele disminuirse la concentración de oxígeno disponible. Esta tecnología es llamada "almacenaje en atmósferas controladas", ya que la proporción de cada gas es mantenida en su nivel original a través del tiempo, independientemente de la temperatura o de otras modificaciones ambientales. Al medir la actividad respiratoria (producción de CO_2 por unidad de tiempo y peso fresco del fruto) la curva obtenida muestra un punto de extinción o compensación (que corresponde a concentraciones de 1-2% de O_2) en que la producción de CO_2 es mínima. Por debajo de dicha concentración de O_2 , el CO_2 producido aumenta nuevamente, alterándose el sabor de los frutos.

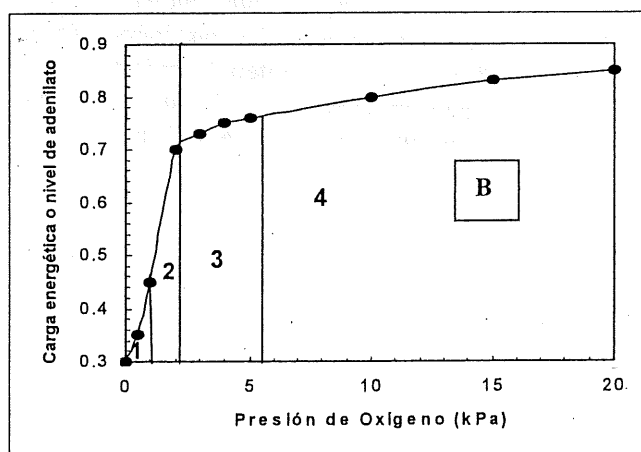
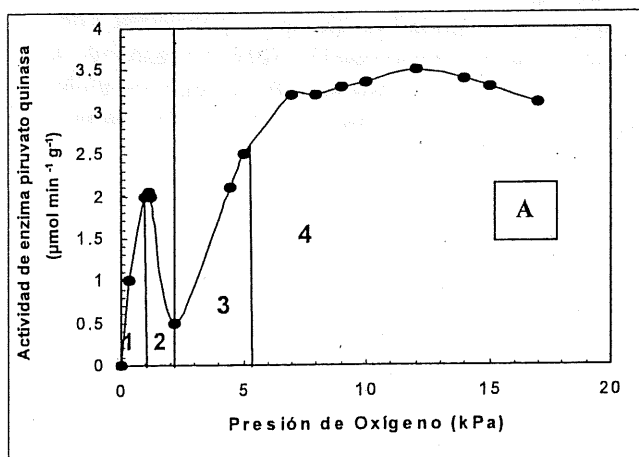
FIGURA 1



- ¿A qué se debe el aumento de producción de CO₂ a concentraciones de O₂ en atmósfera inferior al punto de compensación?
- ¿Qué tipo de alteración experimentará el sabor del fruto?
- ¿Qué reacciones justifican la producción de CO₂ por debajo y por encima del punto de compensación?
- ¿Qué concentración de O₂ elegiría para almacenar frutos en cámara de atmósfera controladas por períodos prolongados?
- ¿Qué otra variable utilizaría para disminuir la tasa respiratoria en la cámara de almacenaje? Justifique.

3) En 1998, un joven investigador examinó las respuestas de los brotes de espárrago (tejido meristemático en activo crecimiento) en un amplio rango de presiones parciales de oxígeno por debajo de la presión normal atmosférica. La respuesta a la presión de oxígeno por parte de los tejidos fue medida en términos de:

- actividad de la enzima piruvato quinasa (gráfico A);
- cambios en los niveles de adenilato o carga energética (CE) de la célula (gráfico B) expresado como $CE = ([ATP] + \frac{1}{2} [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$.



La respuesta dividió ambos gráficos en 2 grandes zonas:

Zona crítica: aquella que no logra sostener un metabolismo equilibrado (subzonas 1 y 2);

Zona homeostática: aquella que mantiene un metabolismo activo y equilibrado (subzonas 3 y 4).

Analizando los efectos de disminución del O₂ se observa que:

- Desde 20 a 5 kPa existe estabilidad en la actividad de la enzima piruvato quinasa (subzona 4);
- Desde 5 hasta 2 kPa se produce una importante caída de la actividad de la enzima (región de stress o subzona 3)
- Desde 2 hasta 1 kPa se verifica un aumento significativo de la actividad de la enzima (subzona 2);
- Desde 1 hasta 0 kPa se observa una nueva caída brusca de la actividad (región de muerte o subzona 1).

a) ¿Qué tipo de reacción cataliza la enzima piruvato quinasa? Escríbala, mencionando sustratos, productos y cofactores. ¿En qué ruta metabólica ubica usted la actividad de la enzima piruvato quinasa? ¿Qué localización subcelular posee?

b) Explique los fenómenos que tienen lugar en cada uno de los 4 sectores de la curva de actividad de la enzima piruvato quinasa:

c) ¿Qué tipo de enzima es, desde un punto de vista metabólico, la enzima piruvato quinasa? Explique su respuesta.

d) Relacione los niveles de actividad enzimática (Gráfico A) con la carga energética o nivel de adenilato (Gráfico B). Explique.

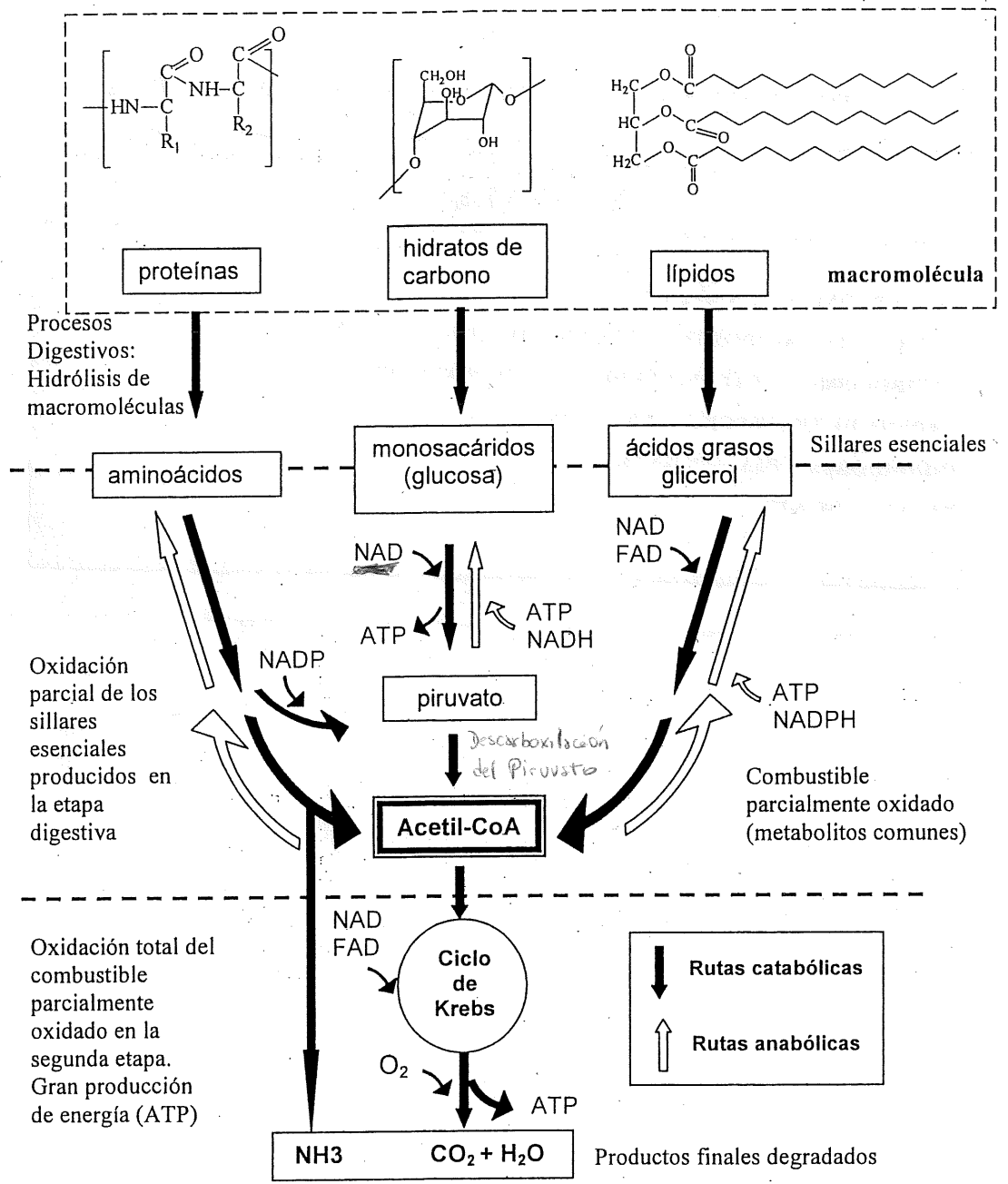
TEMA 4:

CICLO DE KREBS Y CADENA RESPIRATORIA

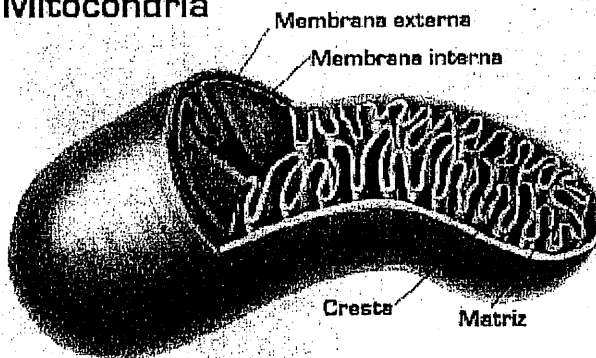
ESQUEMAS

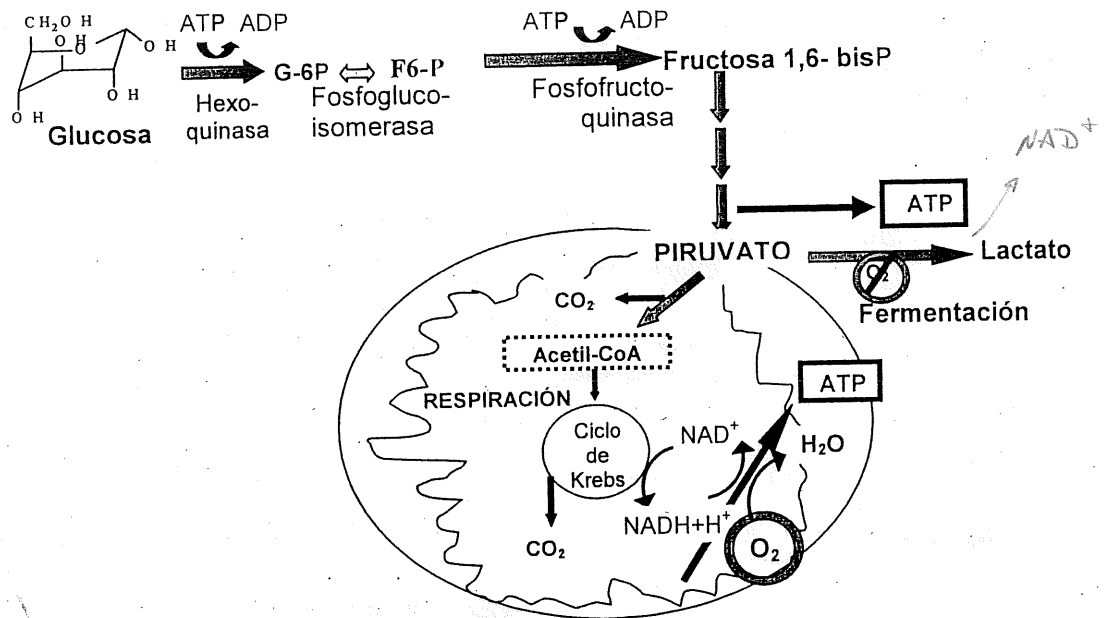
- **DESCARBOXILACIÓN DEL PIRUVATO**
- **CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS - REGULACIÓN**
- **ANFIBOLISMO – REACCIONES DE DRENAJE Y RELLENO**
- **CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO**
- **INHIBIDORES Y DESCOPLANTES**
- **BALANCE DE ATP**

Negro: Vías Catabólicas (oxidación)

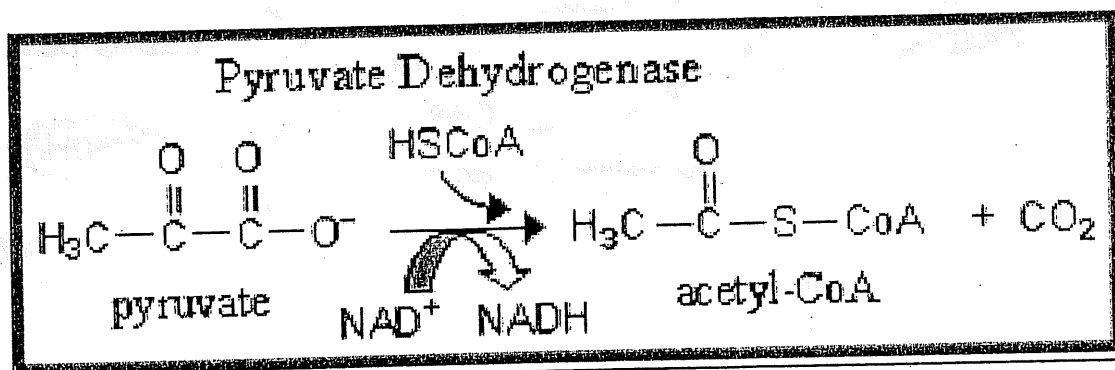
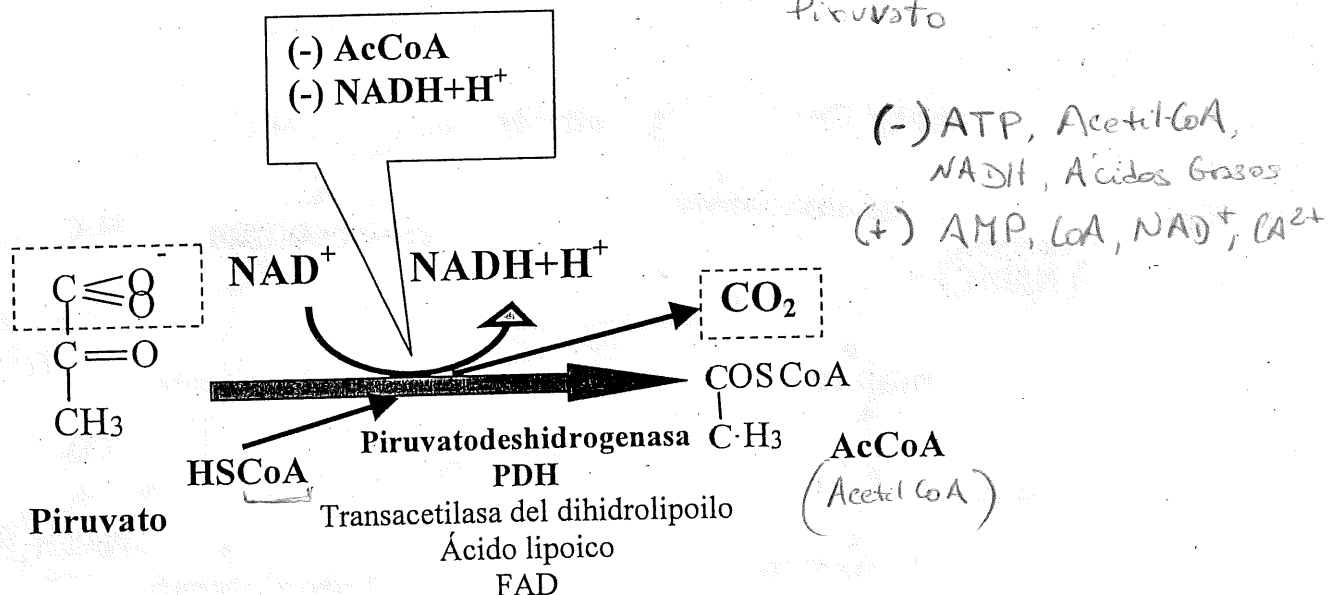


Mitocondria

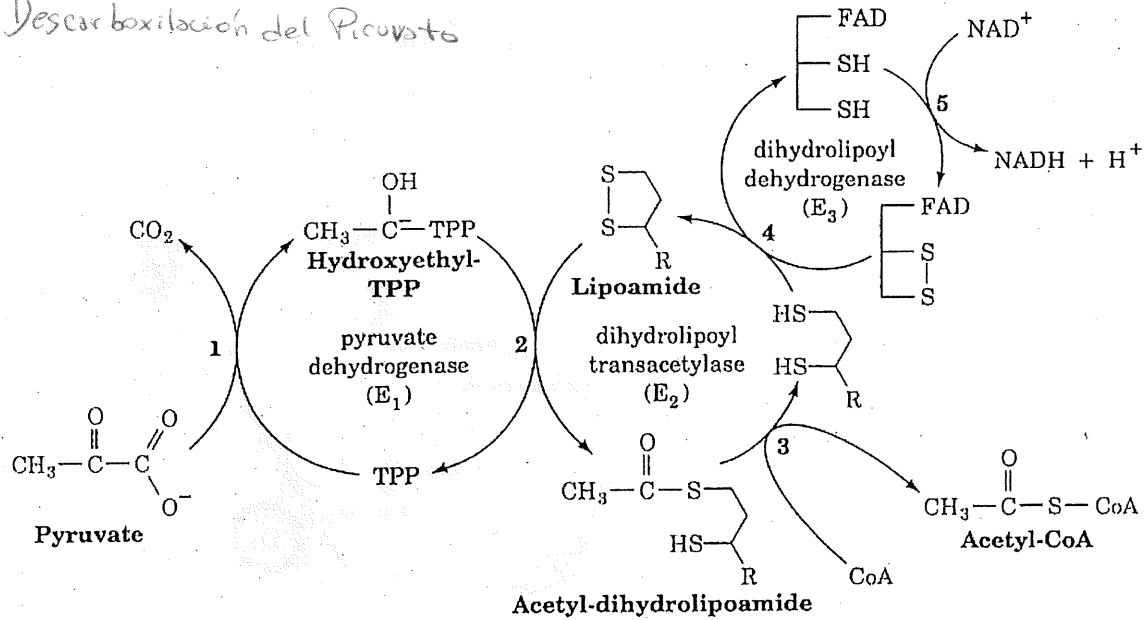




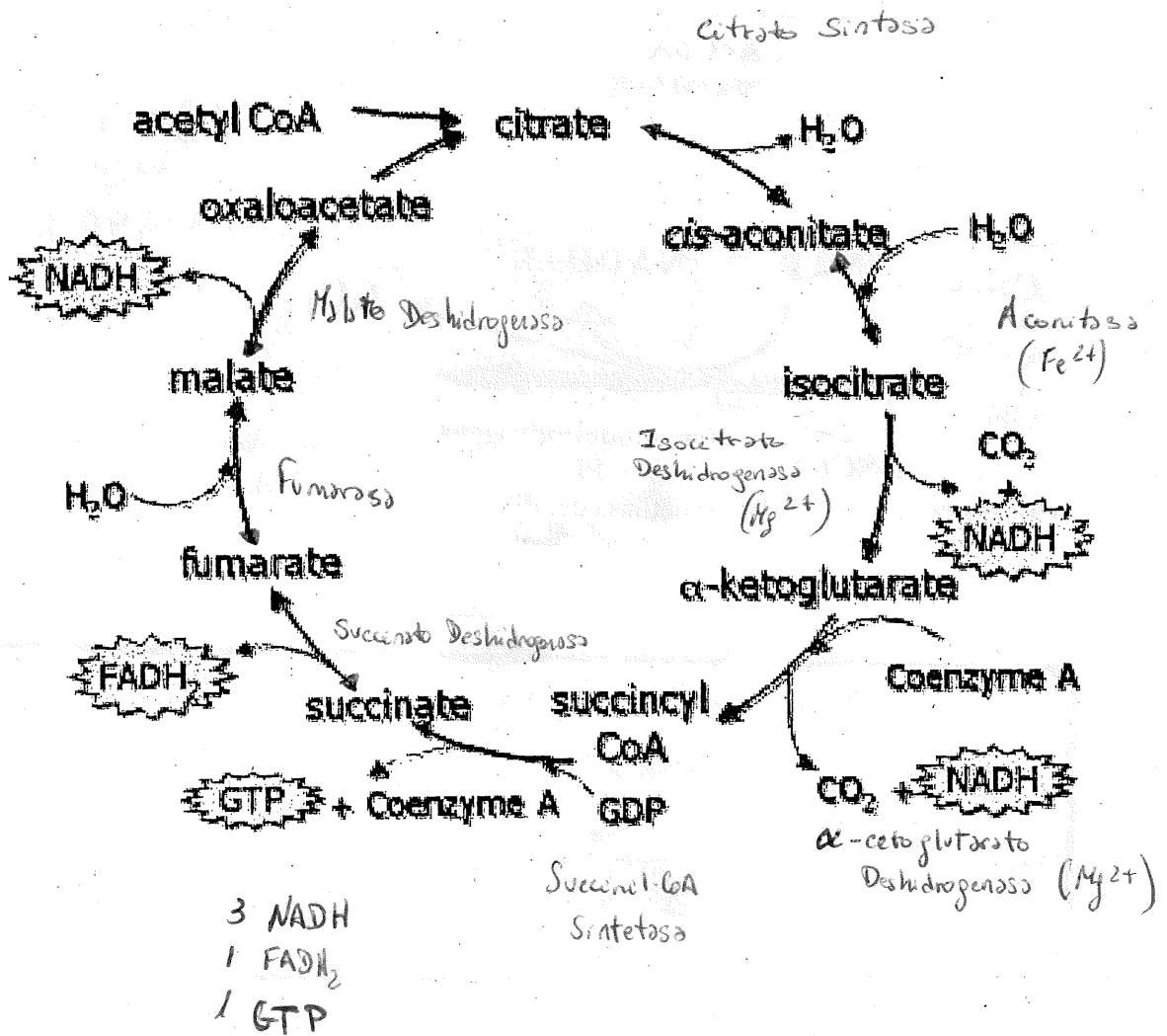
Descarboxilación del Piruvato



Descarboxilación del Piruvato



Ciclo de Krebs

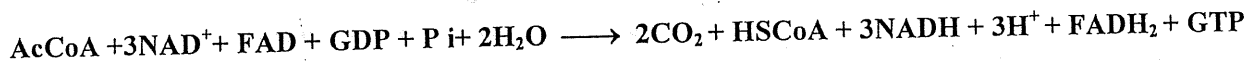
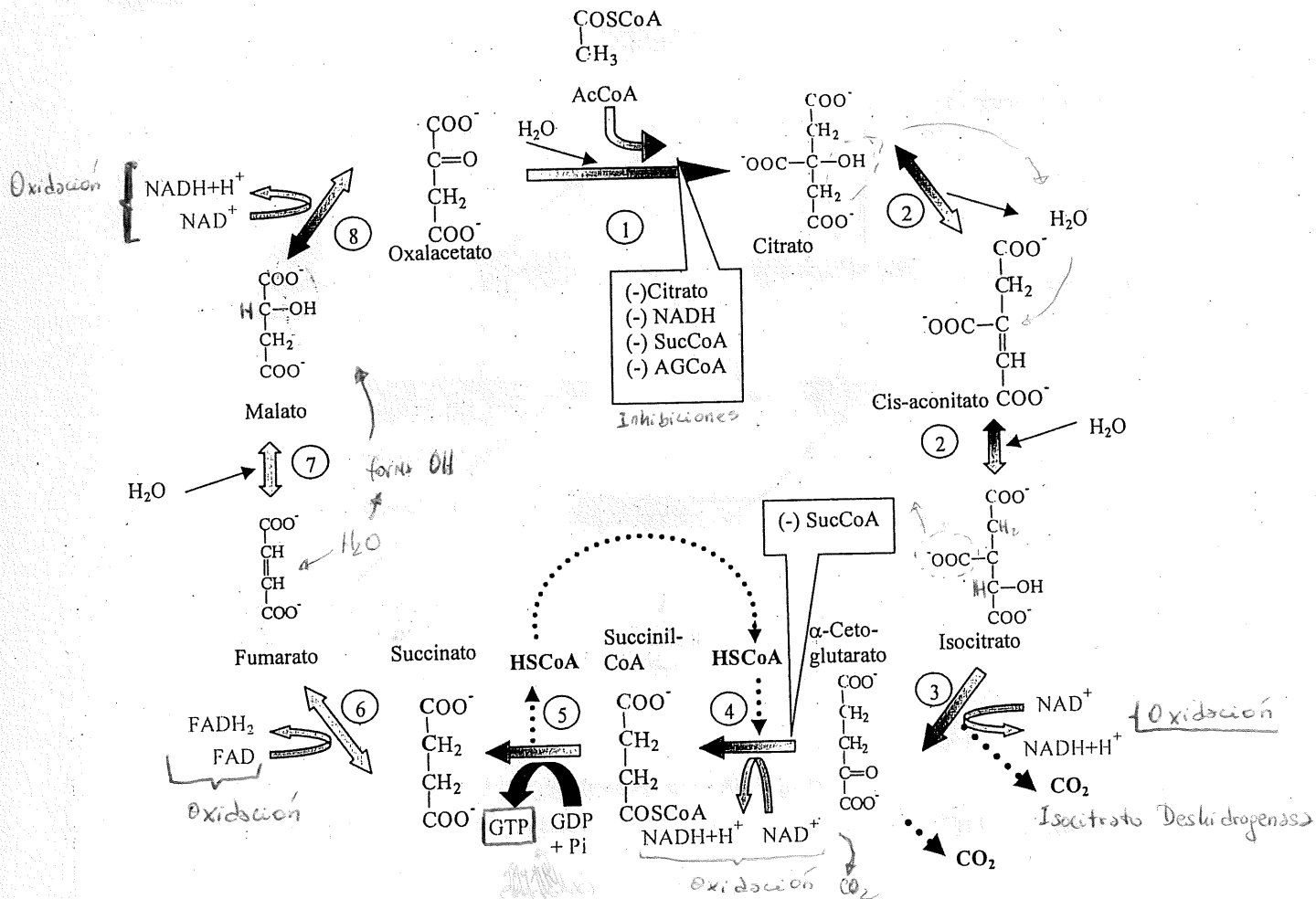




CICLO DE KREBS

Hans Adolf Krebs (1900-1981)

Via Catabolica
Se producen equivalentes de reduccion para la Cadena respiratoria



	ENZIMA	ΔG°' (Kcal/mol)
1	Citrato sintasa	-7,7
2	Aconitasa-Fe ⁺⁺	+2,0
3	Isocitratodeshidrogenasa-Mg ⁺⁺	-5,5
4	α-cetoglutdeshidrogenasa-Mg ⁺⁺	-8,8
5	SuccCoAsintetasa	-0,7
6	Succinatodeshidrogenasa	0
7	Fumarasa	0
8	Malatodeshidrogenasa	+7,1

se forma CO₂

Hay 8 equivalentes de reduccion

REACCIONES de DRENAJE Y RELLENO (ANAPLERÓTICAS)

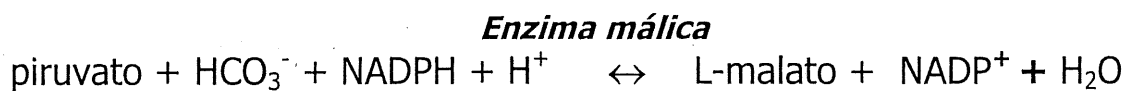
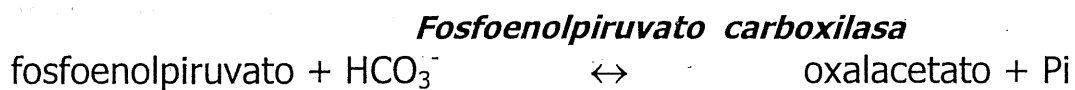
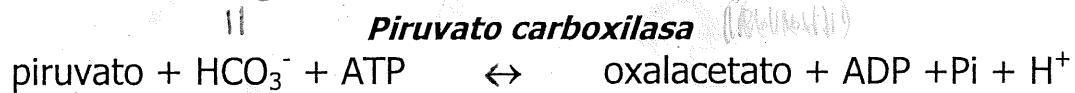
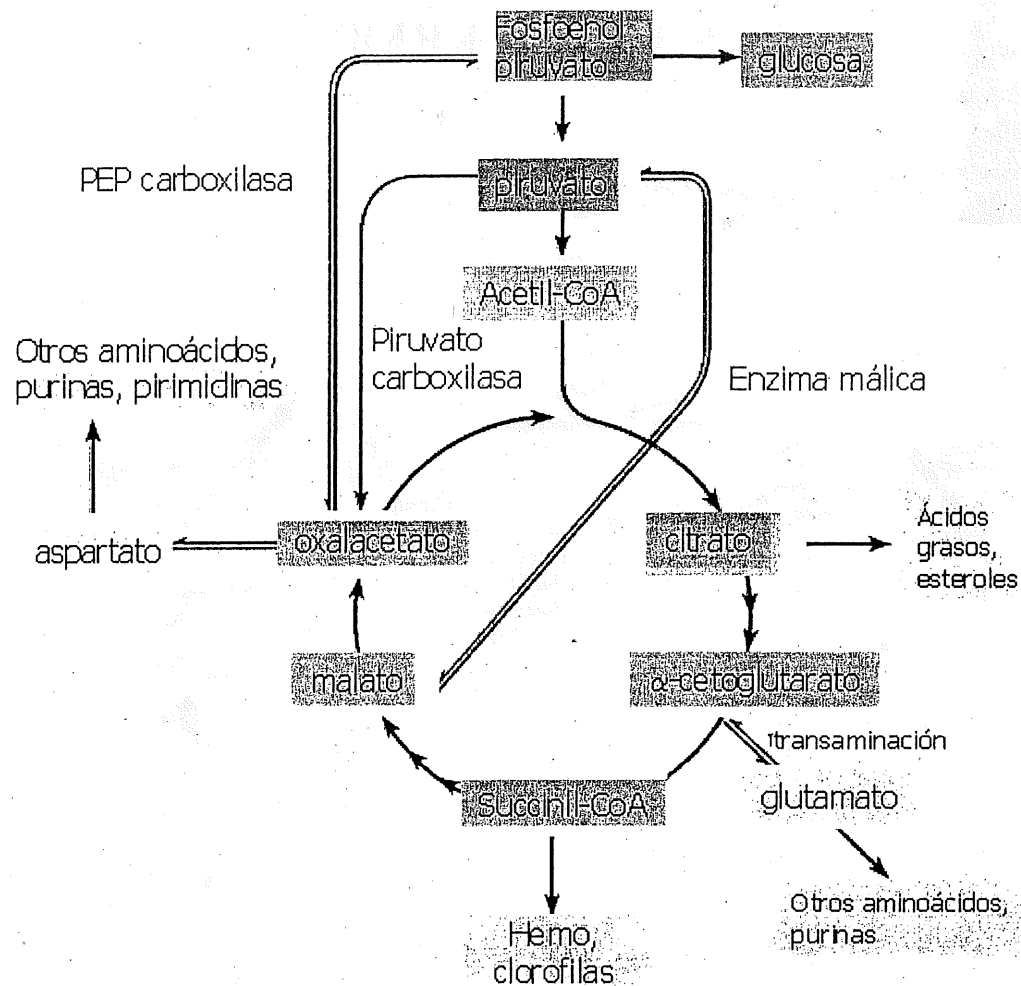
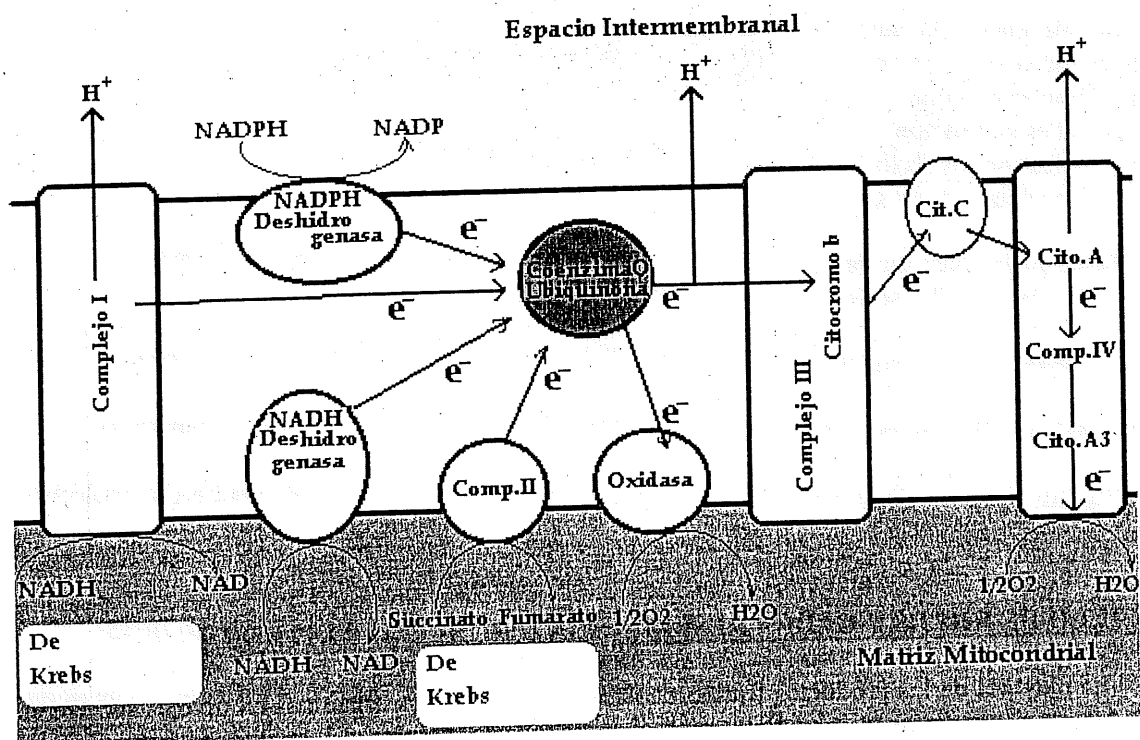


Diagrama detallado de la cadena respiratoria mitocondrial. Muestra la membrana mitocondrial con el espacio intermembrana y la matriz. El ciclo de Krebs libera electrones (e^-) y protones (H^+) a través de complejos I, II, III y IV. El agua (H_2O) se oxida a oxígeno (O_2) en el complejo IV. El oxígeno se reduce a agua (H_2O) en el complejo IV. El ATP se sintetiza a partir de ADP y P_i en la matriz.



NADH
Desidrogenasa

FADH
Desidrogenasa

CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (CUESTIONARIO)

- 1) Del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, indique:
 - a) cuál es el complejo multienzimático que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA;
 - b) la ubicación celular del citado ciclo.
- 2) Señale en el esquema del ciclo de Krebs las reacciones de óxido-reducción, descarboxilación y fosforilación a nivel de sustrato.
- 3) Dé las reacciones redox que ocurren en el ciclo, e indique los probables destinos de las coenzimas reducidas.
- 4) Describa mediante ejemplos el carácter anfibólico del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
- 5) Explique y ejemplifique el concepto de reacción anaplerótica.
- 6) Indique cuáles son los sitios de regulación del ciclo de Krebs.

CADENA RESPIRATORIA (CUESTIONARIO)

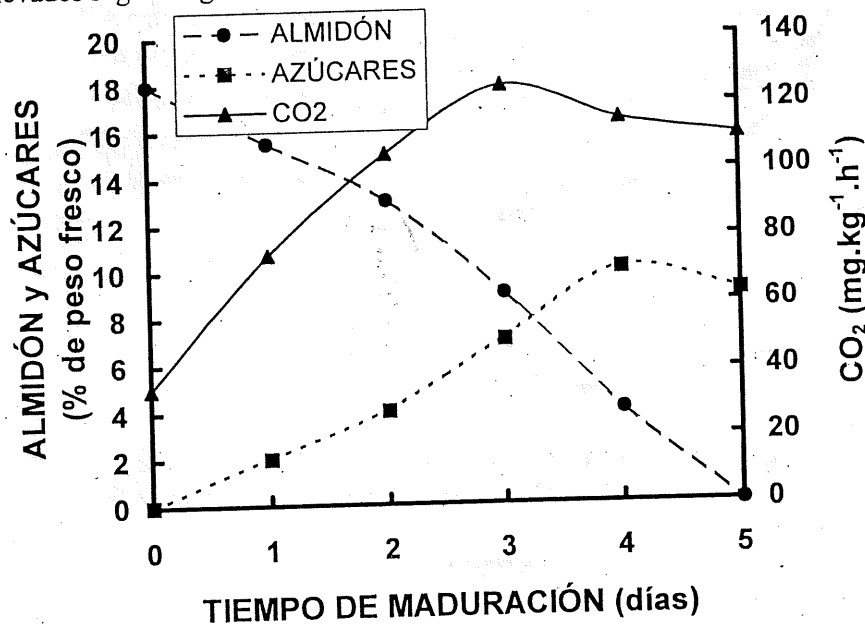
- 1) Indique la ubicación celular de la cadena respiratoria
- 2) En referencia a la cadena respiratoria, indique:
 - a) ¿Cómo se denominan los complejos que integran la cadena respiratoria?
 - b) ¿Cómo se disponen en la membrana mitocondrial?
 - c) ¿Cuál es su función?
 - d) ¿Cuáles son los dadores y aceptores de electrones para cada complejo?
 - e) ¿Cómo se genera el gradiente de protones?
- 3) Describa la constitución y funciones de las ATPasa de membrana e indique cuántas moléculas de ATP son producidas en relación al movimiento de protones.
- 4) Compare los procesos de fosforilación oxidativa y de fosforilación a nivel de sustrato.
- 5) Señale las diferencias entre agentes desacoplantes e inhibidores de la cadena respiratoria.
- 6) Calcule el rendimiento energético correspondiente a la oxidación completa de una molécula de glucosa.

CICLO DE KREBS Y CADENA RESPIRATORIA (PROBLEMAS INTEGRADORES)

- 1) La mayoría de los productos frutihortícolas contienen ácidos orgánicos en niveles superiores a los de requerimiento inmediato para el metabolismo celular. El exceso es generalmente almacenado en vacuola. Por ejemplo, los ácidos málico y cítrico se encuentran presentes en concentraciones relativamente importantes en los frutos de banana, presentándose un incremento en la acidez de la pulpa durante la maduración del fruto.
 - a) Formule en forma completa las reacciones en que intervienen el L-malato y el citrato como producto o sustrato en el ciclo del ácido cítrico, indicando además el tipo de reacción de que se trata, las enzimas y su clasificación, y los cofactores actuantes en dichos pasos metabólicos

b) El citrato es también precursor de la ruta biosintética de lípidos. Ubique dicha ruta subcelularmente y justifique la imposibilidad de participación directa del acetil-CoA mitocondrial en dicho proceso. ¿Qué función cumple la citrato liasa dependiente de ATP en dicho proceso?

c) Un ingeniero agrónomo midió la actividad respiratoria y el contenido de almidón de los frutos de banana durante los cinco primeros días de maduración. El profesional constató que la pérdida de almidón es continua hasta prácticamente anularse al quinto día de medición. La producción de azúcares solubles (sacarosa, glucosa, fructosa) se incrementa hasta el cuarto día, para luego decrecer muy lentamente. La producción respiratoria de CO_2 se incrementa hasta alcanzar un máximo al tercer día, declinando luego ligeramente aunque manteniendo niveles elevados según se grafica a continuación:

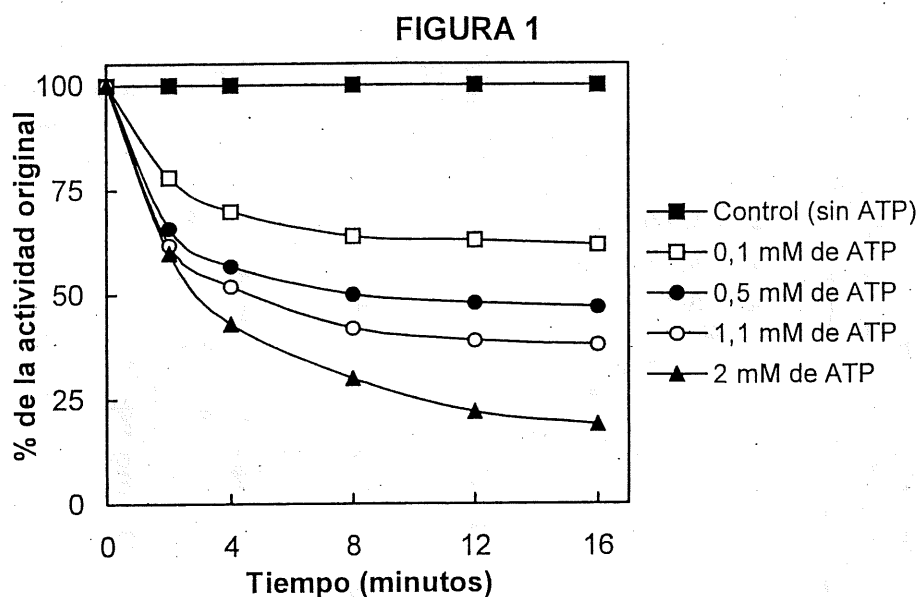


Considerando los procesos enunciados anteriormente (en el párrafo inicial y en el gráfico) y sabiendo que el contenido total de lípidos en pulpa no varía sustancialmente durante la maduración de los frutos de banana:

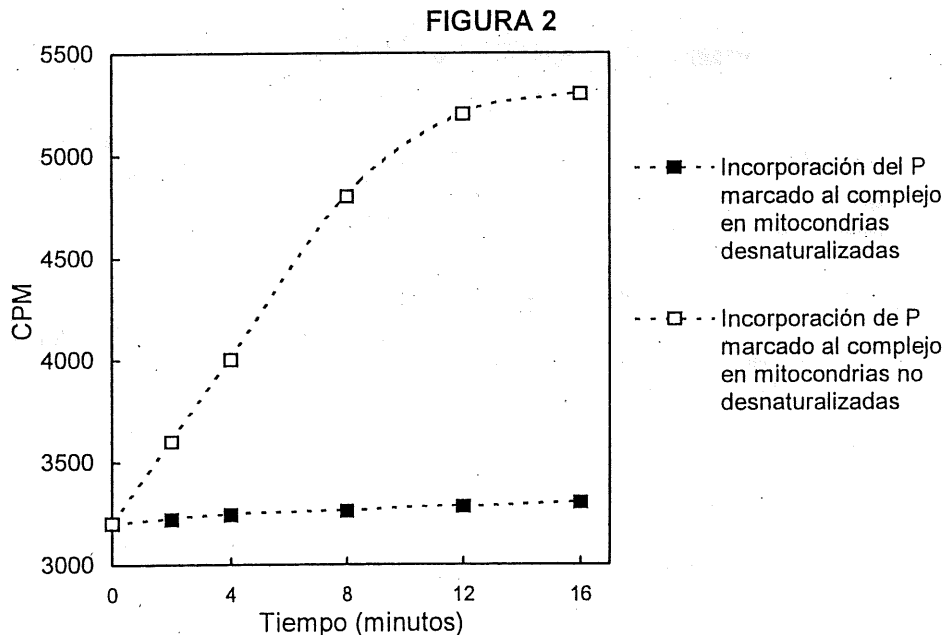
- señale los posibles destinos de degradación del almidón;
- mencione los principales pasos regulatorios de las vías involucradas en dicha degradación y las enzimas intervinientes;
- puntualice por qué la evolución de la actividad respiratoria y del contenido de almidón de los frutos es prácticamente inversa;
- esquematice las etapas en las cuales se produce desprendimiento de CO_2 , identificando las enzimas y cofactores intervinientes.

2) El complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), constituido por tres enzimas que actúan en forma secuencial, cataliza una de las transformaciones del piruvato proveniente de la glucólisis. En la década del '70, un equipo de investigadores describió parcialmente la regulación del complejo piruvato deshidrogenasa en vegetales. A tal efecto, se aislaron mitocondrias a partir de botones florales de brócoli, las que fueron incubadas en una solución apropiada midiéndose a diferentes tiempos la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa.

Simultáneamente, se tomaron alícuotas de la suspensión y se les adicionaron diferentes concentraciones de ATP, acompañadas de oligomicina, un potente inhibidor del complejo ATP sintasa. Los resultados, expresados como porcentaje de la actividad original, se observan en la figura 1.



En otro ensayo, las mitocondrias preincubadas fueron tratadas con ATP marcado ($ATP^{32}P$) comprobándose la incorporación de ^{32}P al complejo de la PDH, como se observa en la figura 2.



- ¿Cuál es la reacción catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa? Incluya sustratos, productos y cofactores intervinientes. ¿Qué solución estimaría apropiada para realizar este ensayo?
- ¿Cuál piensa usted es la razón de la utilización de la oligomicina en la experiencia cuyos resultados se grafican en la figura 1?

c) ¿Qué tipo de regulación indican los resultados contenidos en la figura 1? Manifieste su importancia en función de la economía energética celular. En base al enunciado decida y justifique la posibilidad de una modificación covalente o un cambio conformacional (por alosterismo) de la PDH en presencia de ATP.

d) ¿Qué ocurre en situaciones de baja carga energética celular y baja relación NADH/NAD^+ con la velocidad de funcionamiento del ciclo de Krebs? Mencione otros posibles destinos del piruvato citoplasmático, explicitando la situación metabólica que promueve dicho destino.

3) Se dispone de una suspensión de células facultativas (capaces de crecer en presencia o ausencia de oxígeno), creciendo en condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno). Cuando dicha suspensión celular es pasada a un medio aeróbico, el consumo de glucosa por parte de las células disminuye. Cuando se midió la producción de ácido láctico, este cesa en presencia de oxígeno.

a) ¿Por qué cesa la acumulación de láctico después de la adición de oxígeno?

b) ¿Por qué la adición de oxígeno disminuye la velocidad de consumo de glucosa?

c) Si a la misma suspensión celular crecida anaeróbicamente se le añade n-butilmalonato, un inhibidor del transporte del malato hacia mitocondria, prediga que sucederá con:

- ▶ el proceso glucolítico;
- ▶ el consumo de oxígeno;
- ▶ la formación de lactato;
- ▶ la síntesis de ATP.

En cada caso justifique.

d) En estas condiciones aeróbicas, un grupo de células fue tratada con el compuesto A, y otra con el B. Se midió sobre las mismas la formación de ATP y consumo de oxígeno, obteniéndose los siguientes resultados:

- ▶ Células tratadas con A: bajo consumo de oxígeno y baja síntesis de ATP
- ▶ Células tratadas con B: consumo normal de oxígeno y baja producción de ATP

Indique qué tipo de sustancia es A y B. Justifique.

4) Como resultado de la ingesta del rebrote de un sorgo granífero destinado a pastoreo después de una lluvia que siguió a un período de sequía, se produjo importante intoxicación de los animales. Un ingeniero agrónomo explicó que los sorgos son capaces, en esas condiciones, de generar glucósidos cianogénicos que, a partir de un proceso de hidrólisis, liberan ácido cianhídrico, y que el ion cianuro es un tóxico que inhibe a la citocromo c oxidasa. Responda:

a) ¿Cuál es la ubicación subcelular de este complejo enzimático y qué tipo de reacción cataliza?

b) ¿Puede el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos funcionar sin cadena respiratoria? Justifique.

c) El ingeniero agrónomo confirmó su diagnóstico de intoxicación con cianuro al ver el color rojo brillante de las mucosas de los animales, resultado según él de la elevada concentración de oxígeno en la corriente sanguínea. Sin embargo, "las células mueren por no poder utilizar dicho oxígeno", señaló. Explique esta afirmación desde el punto de vista bioquímico, y señale si el cianuro es un agente desacoplante o no.

d) La acción del tóxico antes citado, en niveles que no produzcan la muerte celular, ¿aumenta, disminuye o no influye en la concentración de ADP? ¿Por qué?

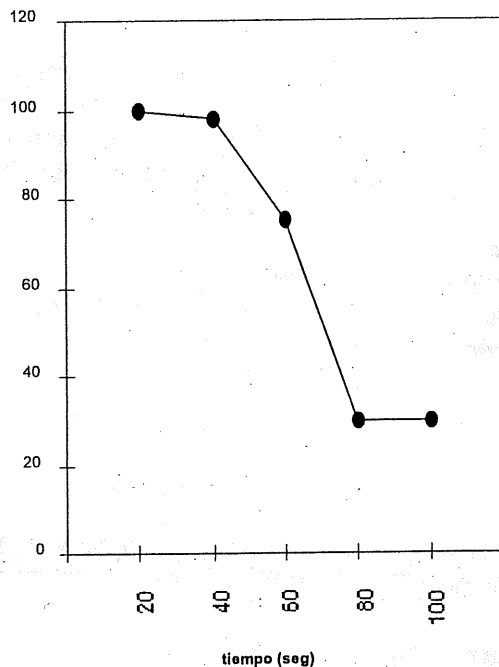
e) En esas condiciones, ¿qué efecto tendrá la acción de la mencionada sustancia tóxica sobre la actividad de la fosfofructoquinasa de glucólisis? ¿Por qué? ¿Qué tipo de regulación es?

f) En idénticas condiciones, ¿qué metabolito de la glucólisis supone Ud. que se acumularía? Justifique.

5) En un experimento con mitocondrias aisladas se midió el consumo de oxígeno en presencia de distintas sustancias agregadas separadamente al medio de incubación. Estas sustancias fueron:

- KCN
- ATP
- ADP
- succinato

Se obtuvo el siguiente gráfico:



a) Indique en qué momento (cuántos segundos a partir del comienzo de la experiencia) fueron agregadas cada una de las sustancias mencionadas. Fundamente su respuesta.

b) Se ha encontrado en vegetales la existencia de una respiración insensible al cianuro. En estos tejidos existen dos oxidasas: la citocromo c oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria) que es sensible al cianuro y la oxidasa alternativa (resistente al cianuro). La acción de la oxidasa alternativa, al igual que la citocromo c oxidasa, necesita del consumo de oxígeno. Ambas vías de transferencia de electrones pueden operar simultáneamente. La forma de comprobar la presencia de la oxidasa alternativa es exponer a las mitocondrias a la presencia de cianuro. De existir esta enzima las mitocondrias sobreviven. Por su parte la oxidasa alternativa se inhibe en presencia de SHAM (ácido hidroxámico).

Realice un gráfico similar al expuesto en la parte a, pero para mitocondrias que presenten respiración insensible al cianuro. Indique además en qué momento incorporaría SHAM para corroborar la existencia de este tipo de respiración. Represente en el gráfico el efecto producido por este inhibidor.

c) Teniendo en cuenta que la acción de la oxidasa alternativa no permite la síntesis de ATP ya que no bombea protones al espacio intermembrana de la mitocondria discuta el posible rol biológico de esta enzima.

6) En un establecimiento agropecuario, parte del rodeo de bovinos tuvo accidentalmente acceso a un sector del campo atravesado por un arroyo cargado de efluentes industriales. Algunos de los animales experimentaron colapso, convulsiones y muerte rápida. Otros, que sufrieron exposición menos intensa, permanecían vivos. Fueron consultados el ingeniero agrónomo y el veterinario del establecimiento.

El ingeniero agrónomo había determinado con anterioridad que esas aguas residuales contenían sulfuro de hidrógeno (H_2S). El veterinario comentó que este tóxico irrita las mucosas y provoca graves problemas respiratorios. Una rápida consulta bibliográfica bastó para conocer que el H_2S inhibe la citocromo c oxidasa.

a) Recordando la ubicación subcelular de la citocromo c oxidasa, mencione al menos otras 4 enzimas o complejos enzimáticos (relacionados o no con la cadena respiratoria) que presenten la misma localización.

b) Se suscitó una discusión entre el personal del establecimiento y los profesionales acerca de la eficacia que presentaría como tratamiento el suministro de O_2 a los animales envenenados. *No, se inhibe el complejo 3*
¿Supone usted que el tratamiento con O_2 sería una medida beneficiosa o no? ¿Por qué?

c) De acuerdo a lo enunciado, ¿clasificaría al H_2S como agente desacoplante, inhibidor de transporte electrónico, o inhibidor de ATPasa? Justifique, mencionando además si se produce gradiente de protones. *Inhibidor de transporte de e^- .*

d) Comente brevemente cómo se verán afectadas en general: a) las rutas de biosíntesis y b) los procesos catabólicos, en células que han experimentado la acción del tóxico en concentraciones lo suficientemente bajas para no causar la muerte. *No va a haber ATP para la biosíntesis.*

b) se acelera la glucólisis

7) Los nitrofenoles y clorofenoles, usados como conservadores de los postes de alambrados, pueden implicar un peligro para el ganado. *(son desacoplantes)*

a) Explique con fundamento bioquímico la causa de esta afirmación.

b) Explique y ejemplifique la diferente acción de un inhibidor de cadena respiratoria y un desacoplante.

c) A partir de la estructura de los compuestos mencionados explique por qué son fácilmente absorbibles por piel y mucosas? *Son moléculas pequeñas con muchos OH.*

d) Qué síntomas muestran y qué tratamientos se indican para animales intoxicados?

Están fatigados y no deberían usar ATP.

En el desacoplante hay transporte de e^- , pero no hay gradiente de protones. Algunos protones salen y otros entran.

TEMA 5: METABOLISMO DE LÍPIDOS

ESQUEMAS

CONTENIDOS

- **DEGRADACIÓN**

- Lipólisis
- Activación de ácidos grasos
- Ingreso del ácido graso a la mitocondria
- Betaoxidación
- Balance de ATP

- **SÍNTESIS**

- Precursores
- Complejo multienzimático de la ácidograso-sintetasa

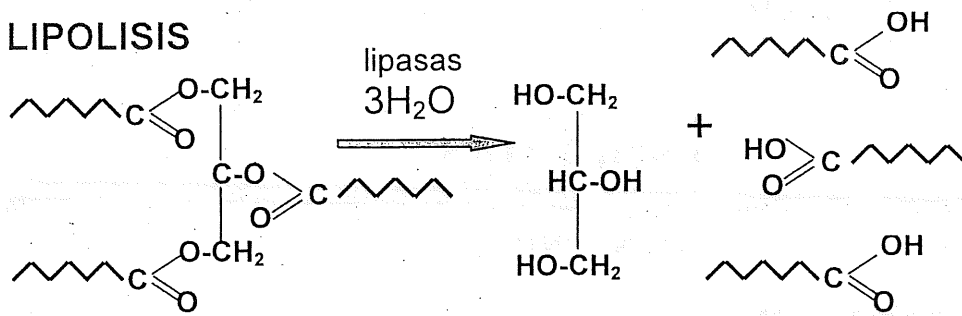
Fosforilación a nivel de sustrato: se cede un P. para formar ATP

Fotofosforilación: fotosíntesis

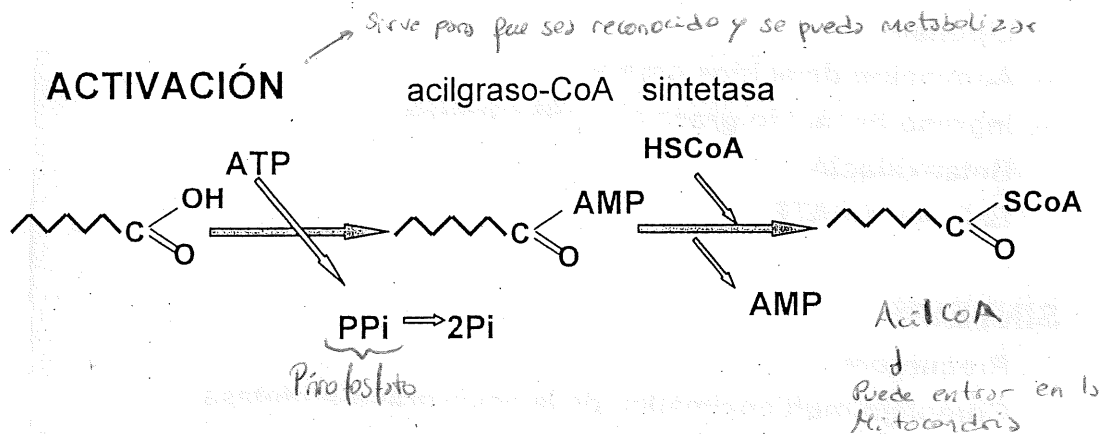
Fosforilación Oxidativa: Cadena Respiratoria

Ruptura de Lípidos

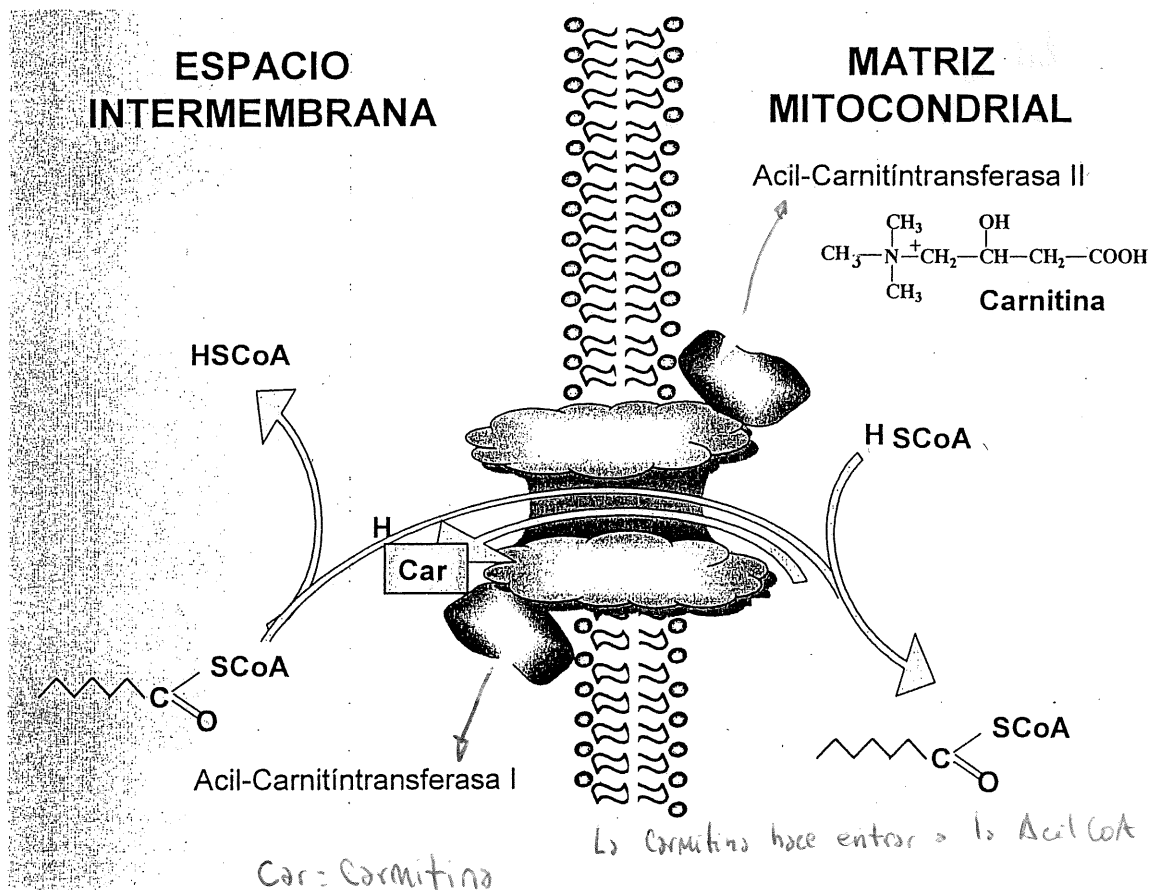
LIPOLISIS



ACTIVACIÓN



INGRESO DEL ACIDO GRASO ACTIVADO A LA MATRIZ MITOCONDRIAL



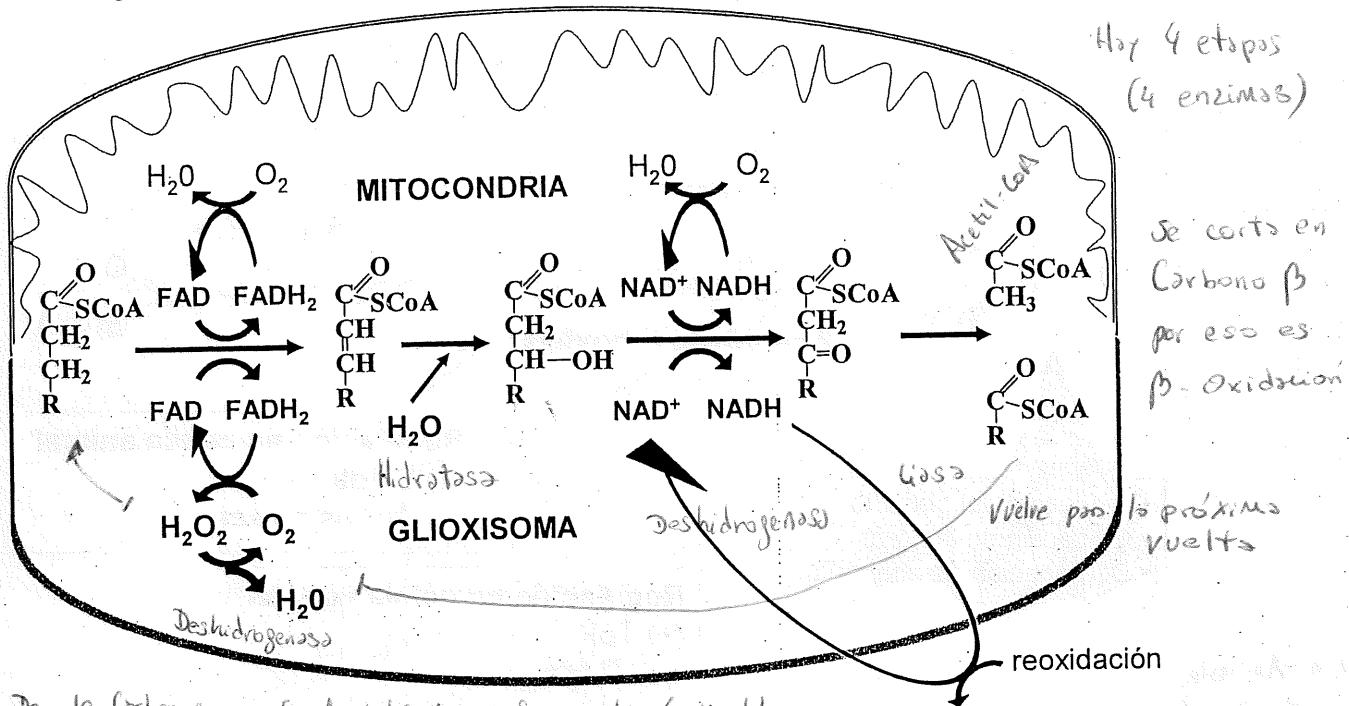
En Vegetales la lipólisis sirve porque los ácidos grasos son precursores de síntesis de glucidos

β-Oxidación de ácidos grasos

→ Degradación de Ácidos grasos

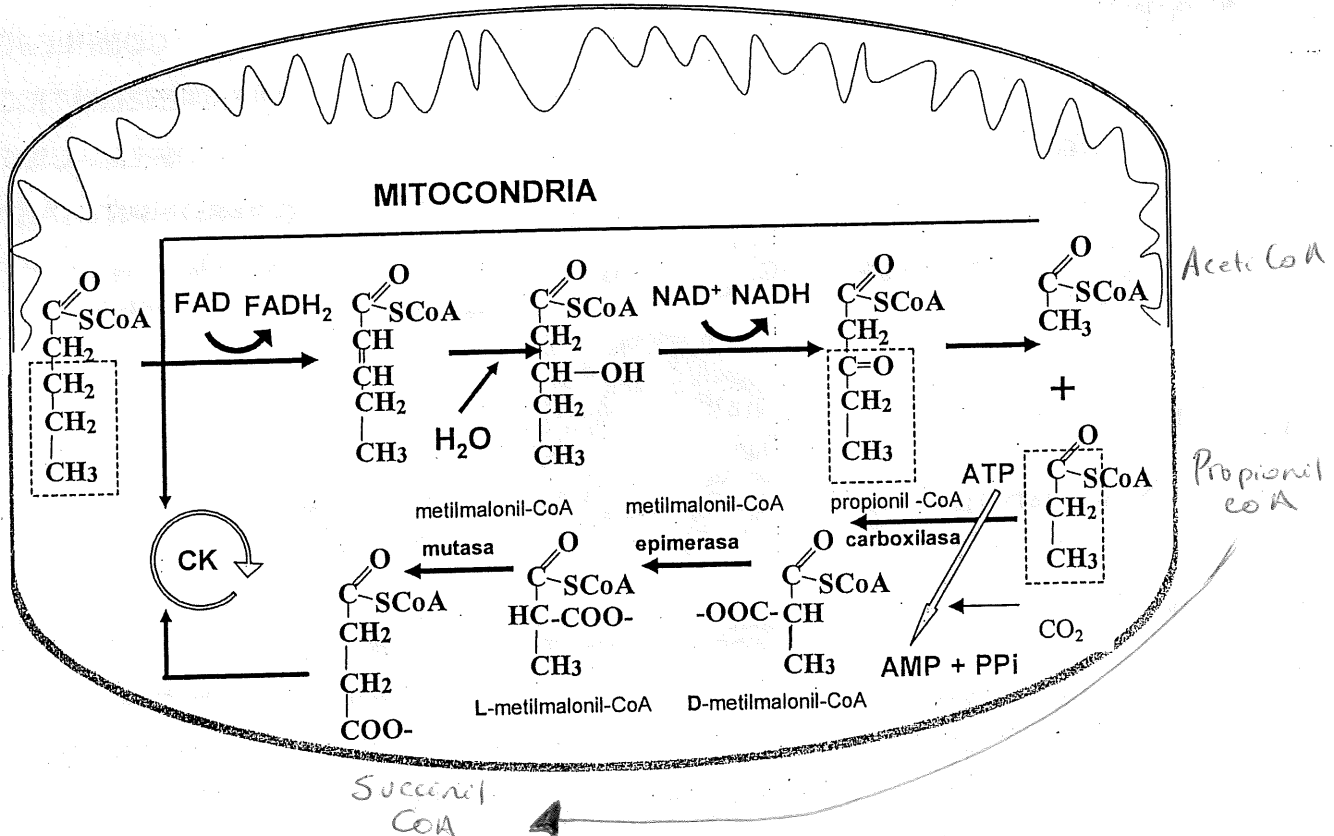
En Animales → Mitochondria

En Vegetales → glioxisomas



De 10 Carbonos → 5 Acetil CoA → se necesitan 4 vueltas
18 Carbonos → 9 Acetil CoA → se necesitan 8 vueltas

β-Oxidación de ácidos grasos de cadena impar



Reacción Anaplerótica

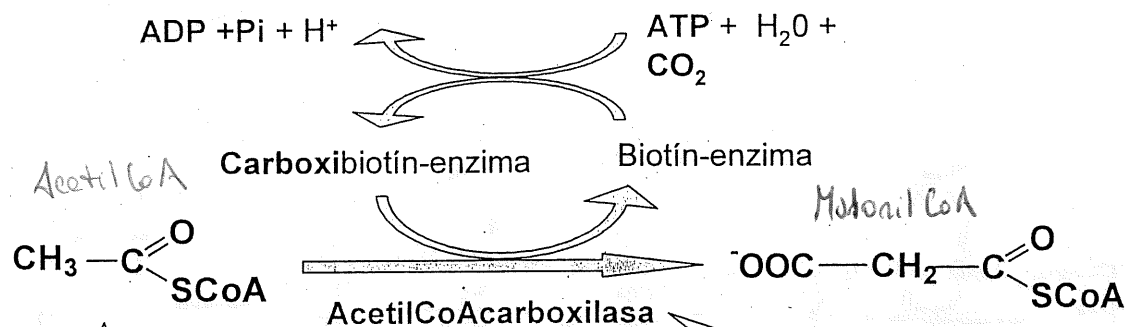
Transformando Malato a Piruvato (por la Enzima Malica Citoplasmática) genera NADP

Los enzimas están en el citoplasma

Importante

PRECURSORES DE LA SÍNTESIS

NADP → en el citoplasma (en animales) → Acetil CoA y Malonil CoA
 ↑ CCP



- Oxidación del piruvato
- Oxidación de ácidos grasos
- Degradación de aminoácidos

Regulación en célula animal
 (+) Citrato
 (-) Ácidos grasos

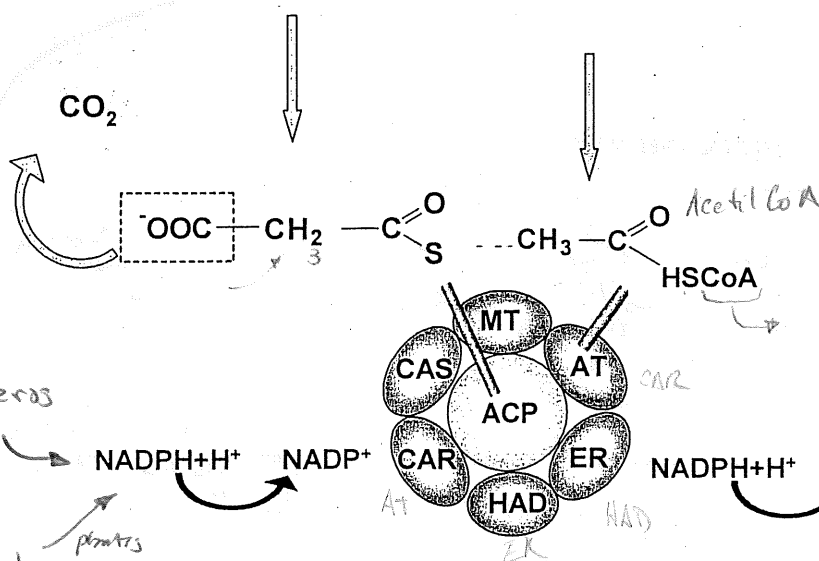
Regulación en célula vegetal

(+) ↑ pH }
 (+) ↑ Mg⁺⁺ } ↑ Luz

En Animales es en el Citoplasma

en Vegetales es en el Cloroplasto

Malonil CoA



COMPLEJO MULTIENZIMÁTICO DE LA ÁCIDO GRASO SINTETASA

formadores de grupos acilo

Fotosíntesis (Luz)
 Vía de los Pentosas Fosfato

ACP = Proteína Transp. de Acilos (SH)

AT = Acetil Transferasa (SH)

CAR = 3-CetoAcil-ACP-Reductasa

MT = Malonil Transferasa

HAD = 3-Hidroxiacil-ACP-Deshidratasa

CAS = 3-CetoAcil-ACP-Sintetasa

ER = 3-Enoil-ACP-Reductasa

Subunidad SH

El ciclo se repite hasta 16 Carbonos

METABOLISMO DE LÍPIDOS (CUESTIONARIO)

DEGRADACIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS, FOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS

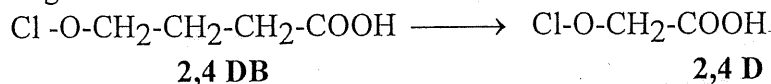
- 1)
 - a) ¿Cuáles son los lípidos de reserva?
 - b) ¿Qué característica diferencial presentan los ácidos grasos que los constituyen en el reino animal y en el vegetal y qué propiedades físicas les confieren?
- 2) En la degradación de los lípidos de reserva contenidos en los liposomas:
 - a) ¿Qué productos se obtienen?
 - b) ¿Qué enzimas intervienen?
 - c) Indique a qué clase enzimática pertenecen.
 - d) ¿Es una reacción reversible?
- 3) ¿Cuáles pueden ser los destinos del glicerol resultante? Formule las reacciones involucradas.
- 4) ¿Cuál es la principal vía degradativa de los ácidos grasos?
- 5) ¿Cómo se activan los restos acilos para ser degradados?
- 6) ¿Cuál es la función de la carnitina en la degradación de los ácidos grasos?
- 7) ¿Qué tipo de reacciones involucra cada espiral completa de β -oxidación?
- 8) ¿Qué enzima/s adicional/es permite/n la β -oxidación de los ácidos grasos insaturados?

SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS, TRIACILGLICÉRIDOS Y FOSFOLÍPIDOS

- 1) ¿En qué ubicación subcelular se lleva a cabo la biosíntesis de ácidos grasos en animales y en órganos vegetales fotosintéticos?
- 2) ¿Cuál es el metabolito precursor para la síntesis de ácidos grasos?
- 3) ¿Cuál es el papel del CO_2 en la reacción de síntesis del malonil-CoA? ¿Qué vitamina actúa como grupo prostético en dicha reacción?
- 4) Explique la diferencia de la síntesis de ácidos grasos de mamíferos, bacterias y vegetales?
- 5) ¿Qué es el ACP y cuál es su grupo activo? ¿Qué papel cumple en la síntesis de ácidos grasos?
- 6) ¿Qué reacciones involucra cada etapa de la adición de una unidad de 2 carbonos?
- 7) ¿Qué coenzima de oxidorreducción es necesaria para la síntesis de ácidos grasos en animales y vegetales? ¿Qué vía metabólica provee esta coenzima en: a) animales y células vegetales no fotosintéticas; b) células fotosintéticas?
- 8) ¿Cuál es la fuente principal del glicerol-fosfato para la síntesis de triacilglícéridos?
- 9) ¿Cuál es el rol del ácido fosfatídico en la síntesis de triacilglícéridos y fosfolípidos?
- 10) ¿Cómo es activada y transportada la base nitrogenada en la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina?

METABOLISMO DE LIPIDOS (PROBLEMAS INTEGRADOS)

1) El 2,4 DB es un producto con un mecanismo de acción peculiar. En su estado original, presenta muy poca actividad herbicida. Sin embargo, una vez aplicado sobre el vegetal, experimenta en el interior de las plantas susceptibles una transformación a 2,4 D, sustancia fuertemente fitotóxica. Asocie esta transformación al metabolismo de los ácidos grasos.



- a) La transformación de 2,4 DB en 2,4 D presenta un ΔG° negativo. ¿Es un proceso exergónico o endergónico? ¿Por qué?
- b) ¿En qué lugar de la célula es transformado el 2,4 DB en 2,4 D?
- c) Además del 2,4 D, ¿qué otros productos se forman como resultado final de la transformación del 2,4 DB (incluya cofactores)?
- d) En el metabolismo de los lípidos, esos mismos productos sufren transformaciones posteriores. Dos de los productos formados mencionados en el punto 3, son cofactores que se oxidan en la cadena transportadora de electrones. Mencione:
 - d.1) el tipo de cofactor de que se trata (activador, coenzima o grupo prostético);
 - d.2) el nombre del aceptor primario de los electrones cedidos por estos cofactores en cadena respiratoria;
 - d.3) el número total de moléculas de ATP que se genera en cada caso, y la razón por la cual dicho número difiere según el cofactor en cuestión (considere cadena respiratoria completa).
- e) ¿Cuáles serían los posibles destinos del tercer producto formado según se mencionó en el punto 3?
- f) Se sabe que algunas especies leguminosas (ej.: alfalfa, tréboles), por razones exclusivamente bioquímicas, no son afectadas al aplicarse 2,4 DB. Sin embargo, sí son afectadas al aplicarse 2,4 D. Discuta alguna razón bioquímica posible para la ocurrencia de este fenómeno.

2) Desde la década del '70, los investigadores de las ciencias agropecuarias han buscado formas de controlar las malezas gramíneas en los cultivos. En 1980, un investigador descubrió un herbicida graminicida (diclofop metilo) que inhibe la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA.

- a) ¿Cuál es la principal ruta metabólica afectada y por qué? En condiciones normales, la secuencia de reacciones que conforman dicha ruta ¿es endergónica o exergónica? ¿Por qué?
- b) ¿Cuál es la enzima inhibida por el herbicida? ¿A qué clase enzimática pertenece? ¿Qué tipo de reacción cataliza dicha enzima? Esquematice la reacción.
- c) Mencione la vitamina que actúa como cofactor para dicha enzima y clasifique ese cofactor (activador, coenzima o grupo prostético).
- d) El paso inhibido por el herbicida es considerado limitante en la velocidad de la ruta metabólica. Mencione qué metabolito/s incrementa/n la velocidad de la ruta, y cuál la desacelera en condiciones normales. Teniendo en cuenta el concepto de regulación enzimática de una ruta, ¿cómo catalogaría a esta enzima? Discuta.
- e) La ruta metabólica en cuestión requiere el aporte, en determinados puntos de su trayecto, de energía química en 2 formas. Mencione los mismos, indicando los pasos en que dichos requerimientos tienen lugar.

- f) ¿Qué estructuras celulares se ven crucialmente afectadas al aplicar esta clase de herbicidas en especies susceptibles? Discuta el alcance de dicha incidencia.
- g) Un ingeniero agrónomo, efectuando aplicaciones del herbicida, observó que las malezas susceptibles al mismo experimentaban clorosis (amarillamiento) de las hojas, por lo cual consideró posible que el herbicida produjera daños a nivel de cloroplasto. ¿Considera usted correcta esa apreciación? Fundamente la respuesta.

METABOLISMO DE LIPIDOS

(TRABAJO PRÁCTICO EXPERIMENTAL)

VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA DE SEMILLAS DE OLEAGINOSAS

Introducción:

Las lipasas son glicero-hidrolasas (3.1.1 clasificación decimal), que se caracterizan por ser poco específicas, es decir que catalizan la misma reacción sobre más de un sustrato. En el caso particular del trabajo práctico a realizar a continuación la enzima se desempeña mejor a pH ácido.

Material Vegetal:

Se utilizarán semillas de *Ricinus communis* L. (ricino o tártago), las cuales fueron embebidas en agua durante 48hs a 30°C.

Técnica:

Se realizará una suspensión de semillas, a partir de 4 semillas a las que se debe quitar el tegumento y triturar sobre un mortero con 5 ml de agua. Luego se malaxaran agregando 10ml de agua, se filtrará por tela para obtener el extractivo que se utilizará en la incubación.

Como sustrato se utilizará una emulsión de manteca, la cual se preparará suspendiendo 0,5g de manteca en 10ml de agua que será calentada hasta formar la emulsión.

Pasos a seguir:

Tubo de ensayo N°	1	2	3
Suspensión se semillas (ml)	5	5	-
Emulsión de manteca (ml)**	3	3	3
Solución reguladora (ml)*	1	1	1
Tratamientos	calentar a 100°C 2'	-	sin susp. de semillas
<i>Incubar a 37°C durante dos horas</i>			
<i>Agregar la suspensión de semillas al tubo 3 (5ml)</i>			
Alcohol (ml)	12	12	12
Fenolftaleína (gotas)	5	5	5
<i>Agitar los tubos para homogeneizar el contenido</i>			
Titulación con NaOH 0,01N(ml)			

* Solución reguladora pH5 AcOH/AcONa 0,1M.

** Tomar la precaución de que la temperatura de la emulsión no produzca la precipitación de las enzimas.

TEMA 6: FOTOSÍNTESIS

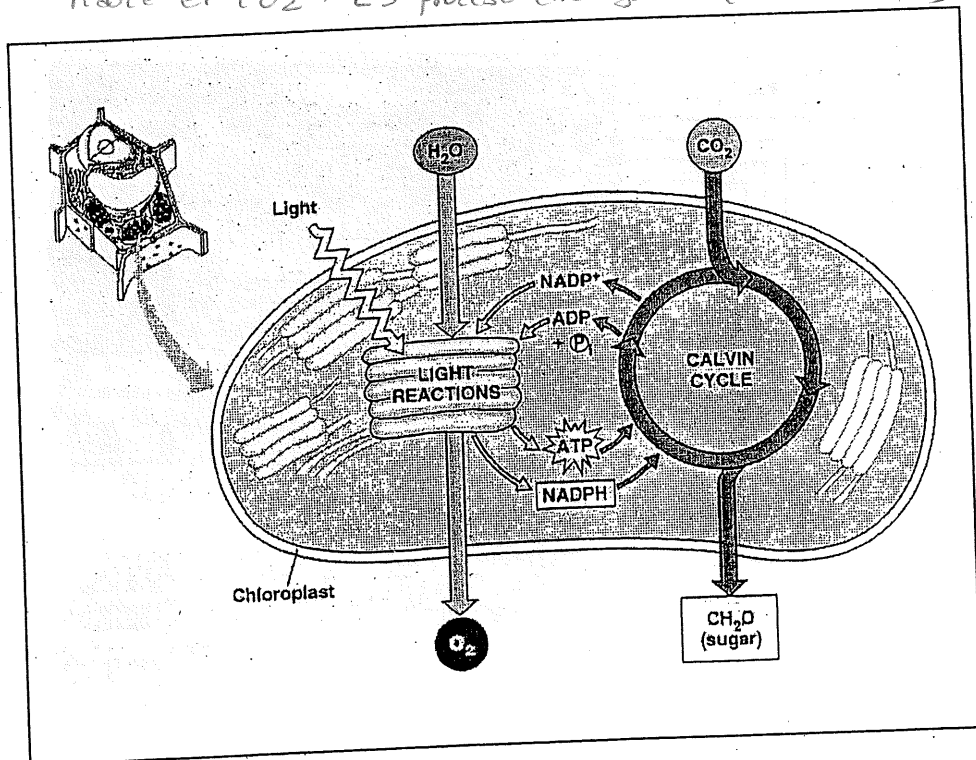
Proceso de Síntesis con consumo de energía. El NADPH se reduce en la etapa luminica.

ESQUEMAS

CONTENIDOS

- Etapa bioquímica de la FS (Ciclo de Calvin)
- Fotorrespiración
- Asimilación fotosintética diferencial: Plantas C_4
- Fotosíntesis en plantas CAM (metabolismo ácido de crasuláceas)

Etapa Bioquímica: ocurren reacciones en el estroma, donde se reduce el CO_2 . Es proceso endergónico (necesita ATP)

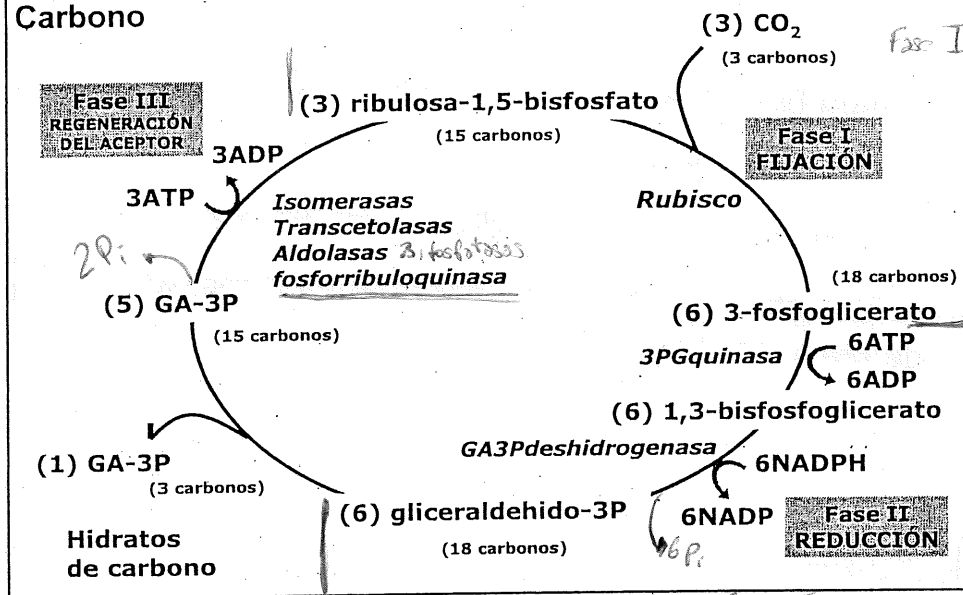


CFRC: Ciclo Fotosintético de la Reducción del Carbono

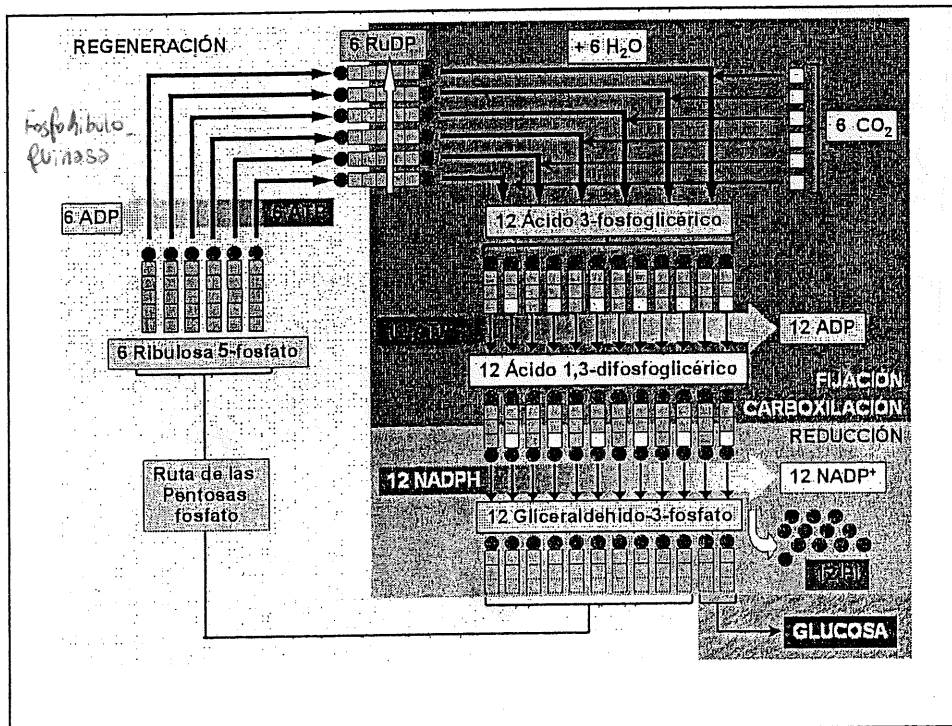
El CO_2 entra por los estomas

Rubisco: Ribulosa Bifosfato Carboxilasa Oxigenasa

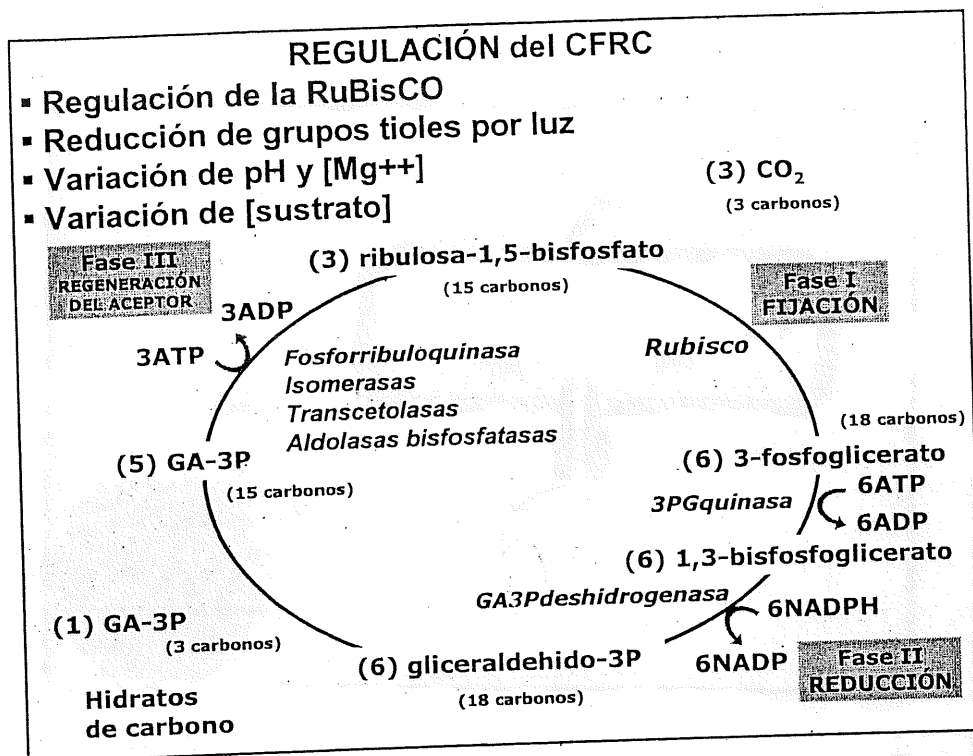
CICLO DE CALVIN



El producto más importante del ciclo es la glucosa



6 CO_2
12 NADPH
18 ATP



Regulación

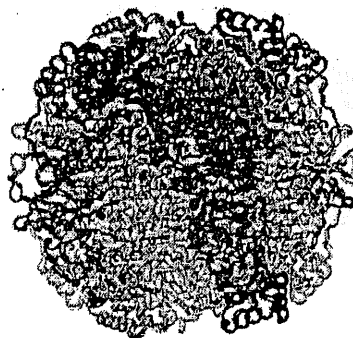
RuBisCO = Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa

- ^{PM molecular} PM = 550 kD
- 8 subunidades de 55 kD con 1 centro activo c/u
- 8 subunidades de 14 kD
- Afinidad por CO_2 = 90-100 veces ^{superior} afinidad por O_2 (K_M 12 y 250 μM)
- V de captura de CO_2 = $f([CO_2], [CO_2]/[O_2], [RuBP], RuBisCO^*$

El K_m por CO_2 es mayor que el de O_2

El pH es alcalino

La lisina es esencial para la función de RuBisCO.



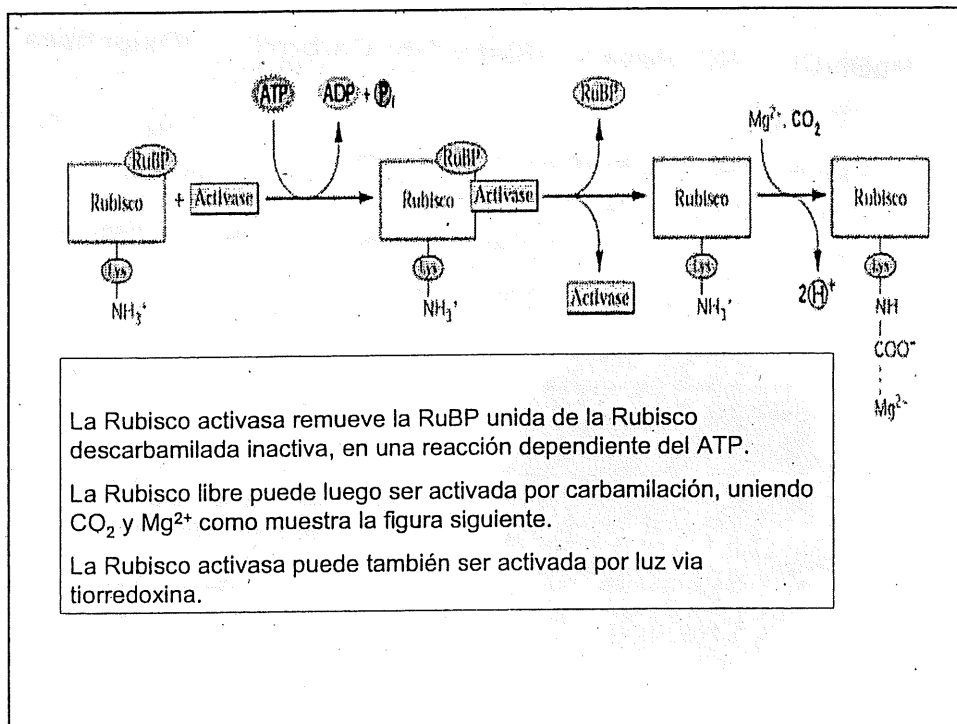
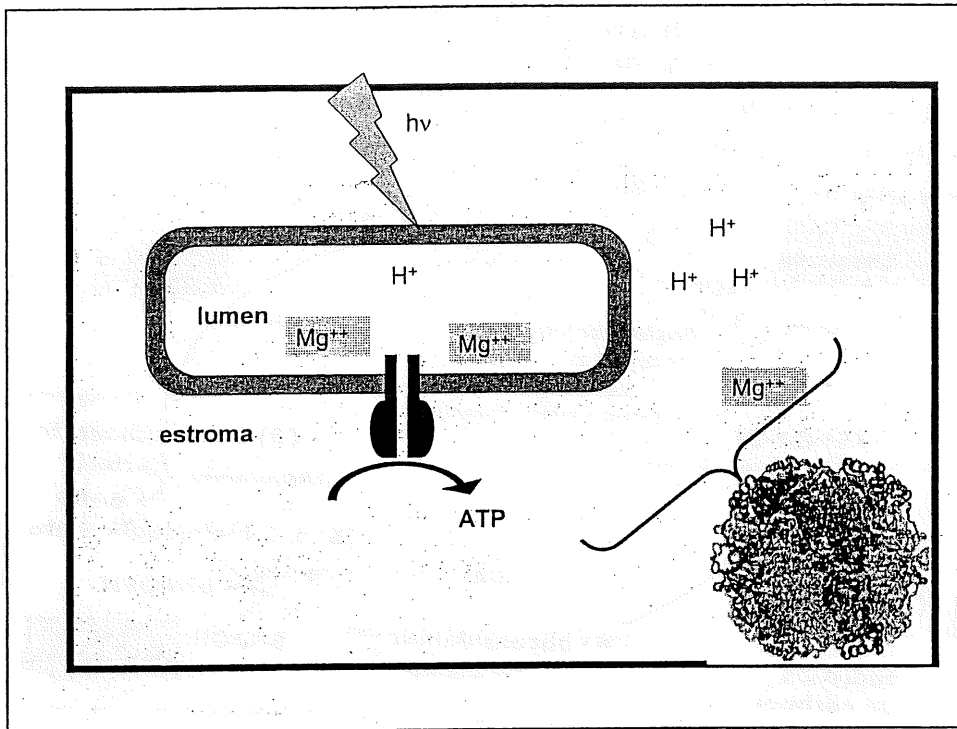
Rubisco. Cada holoenzima está compuesta de 8 subunidades grandes (azul y celeste) y 8 pequeñas (rojo y naranja). Los rulos amarillos indican la posición del sitio activo.

Si la Rubisco usa O_2 se produce la Fotorespiración.

La Rubisco es Activada por: CO_2 , luz, Mg^{2+} , Rubisco Activado, pH, ATP.

O_2 y Rubisco/3PGA

La Rubisco Activada funciona gracias a la lisina y el Mg^{2+} . Se une con CO_2



La Rubisco activasa remove la RuBP unida de la Rubisco descarbamilada inactiva, en una reacción dependiente del ATP.

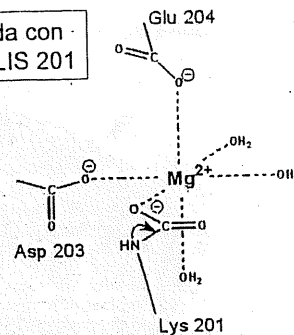
La Rubisco libre puede luego ser activada por carbamilación, uniendo CO_2 y Mg^{2+} como muestra la figura siguiente.

La Rubisco activasa puede también ser activada por luz via tiorredoxina.

Activación de la Rubisco por carbamilación. La Rubisco es activada por unión de CO_2 y Mg^{2+} .

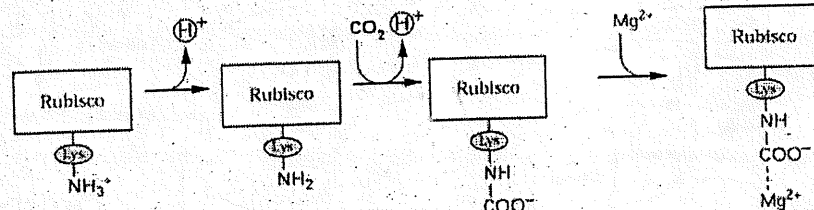
La reacción de activación, que libera protones, es promovida por incrementos en el pH del estroma y por la concentración de Mg^{2+} asociado con la iluminación del cloroplasto.

Enzima Activada con carbamato en LIS 201

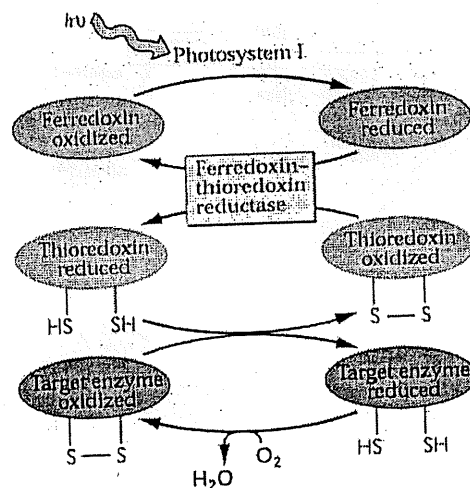


inactiva

activa



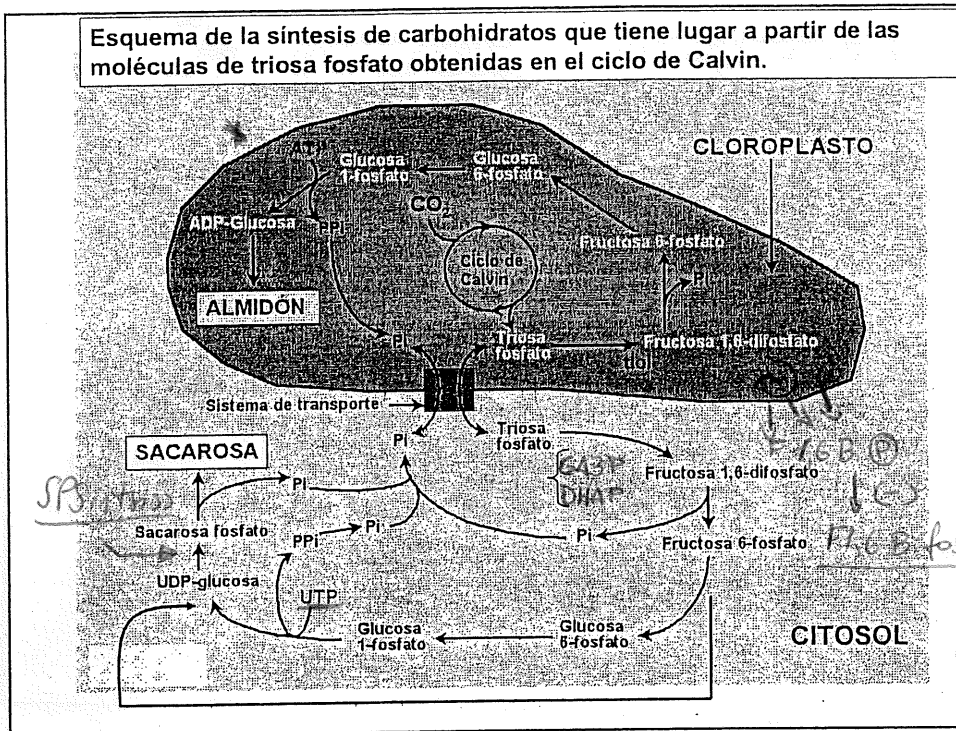
Regulación por la luz



El sistema ferredoxina-tiorredoxina provee un mecanismo para la activación dependiente de la luz o la desactivación de las enzimas. La transferencia fotosintética de electrones por el fotosistema I conduce a la reducción de la ferredoxina, una proteína Fe-S. La ferredoxina reducida, a su vez, reduce a la tiorredoxina, una proteína disulfuro regulatoria, en una reacción catalizada por la ferredoxina-tiorredoxina reductasa. La tiorredoxina reducida puede reducir las uniones disulfuro de numerosas proteínas, modulando así sus actividades. La transferencia de electrones se muestra en rojo. En la oscuridad, el O_2 oxida tanto la enzima como la tiorredoxina.

ADP - Glucose pyrophosphatase

Entra P:
y Sale
la triosa
por antiparte
Así se mantienen
las cargas



S.P.

SACAROSA

Sacarosa fosfato → Pi → Fructosa 6-fosfato

Fructosa 6-fosfato → Fructosa 1,6-difosfato → G3P + DHAP

P.P.i → Pi

P7.6.B. fotosintese

Este diagrama ilustra las rutas metabólicas para la síntesis de almidón y celulosa a partir de glucosa-1-fosfato.

Síntesis de almidón:

- La **glucosa-1-fosfato** se convierte en **ADP-G** mediante la enzima **ADP-G pirofosforilasa**, liberando **PP_i** (pirofosfato inorgánico).
- El **ADP-G** se polimeriza para formar **almidón (n)**.
- El **almidón (n)** puede ser convertido en **almidón (n+1)**.

Síntesis de celulosa:

- La **glucosa-1-fosfato** se convierte en **GDP-G** mediante la enzima **GDP-G pirofosforilasa**, liberando **PP_i**.
- El **GDP-G** se polimeriza para formar **celulosa**.

Regulación y otros detalles:

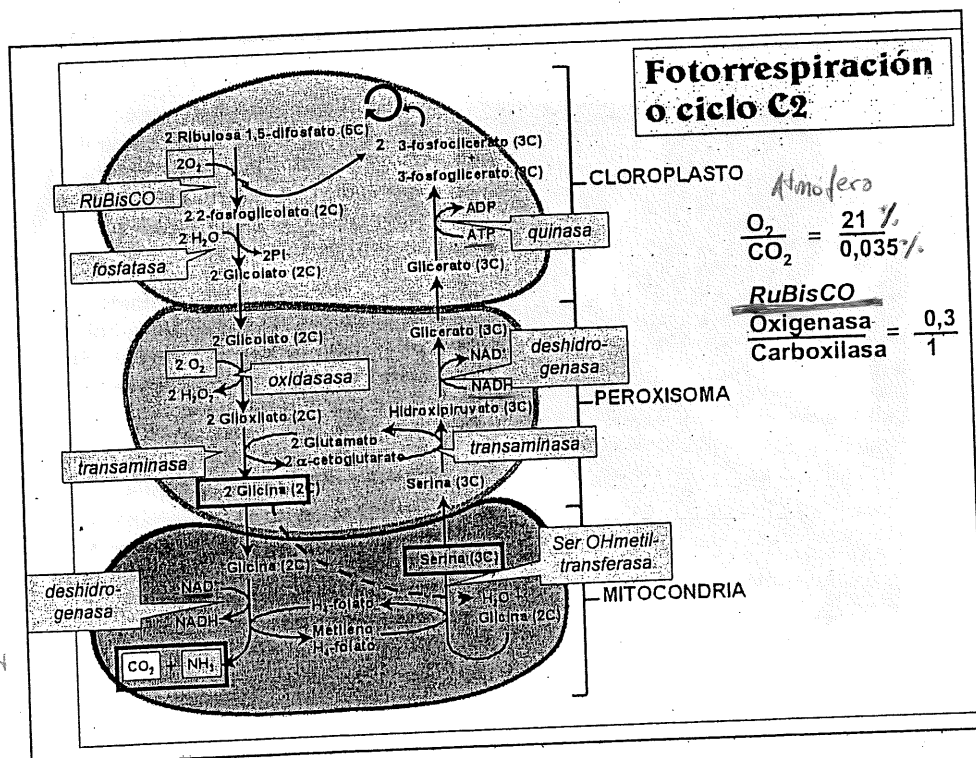
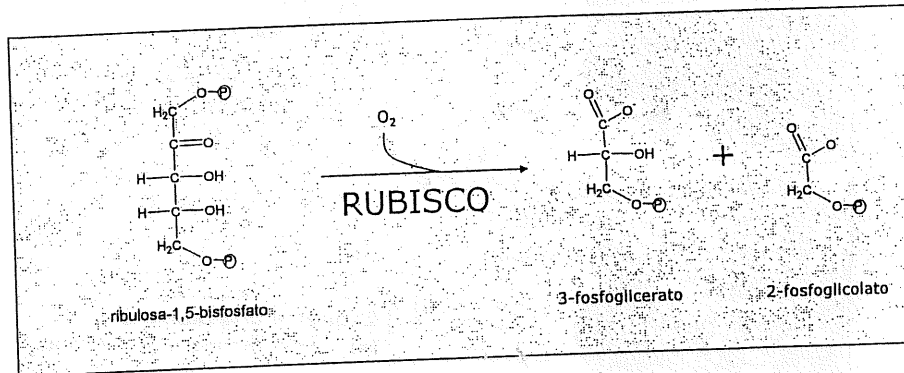
- Las reacciones de conversión de glucosa-1-fosfato a ADP-G y GDP-G están reguladas por **ATP** y **UTP** (que se convierte en **GTP**).
- Se muestran las estructuras químicas de los nucleótidos de glucosa (ADP-G, GDP-G) y de los nucleótidos de fructosa (UDP-G).
- Se indica la presencia de **fructosa** y **sacaroza** en la parte inferior del diagrama, vinculados a **fructosa-6-fosfato** y **UDP**.

Con UTP se fabrica sacarosa:

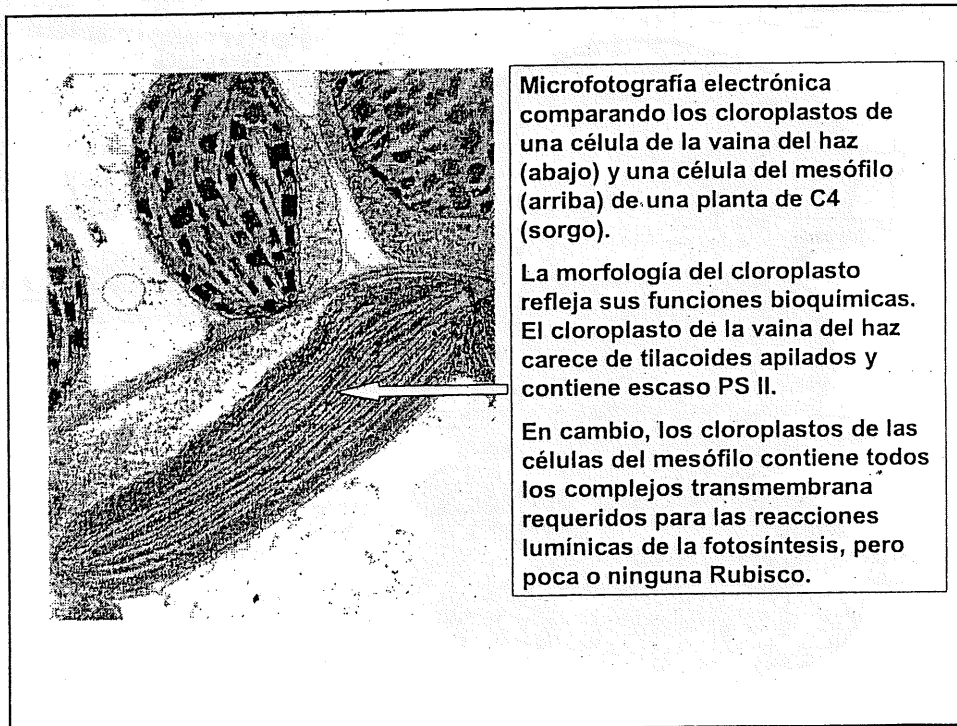
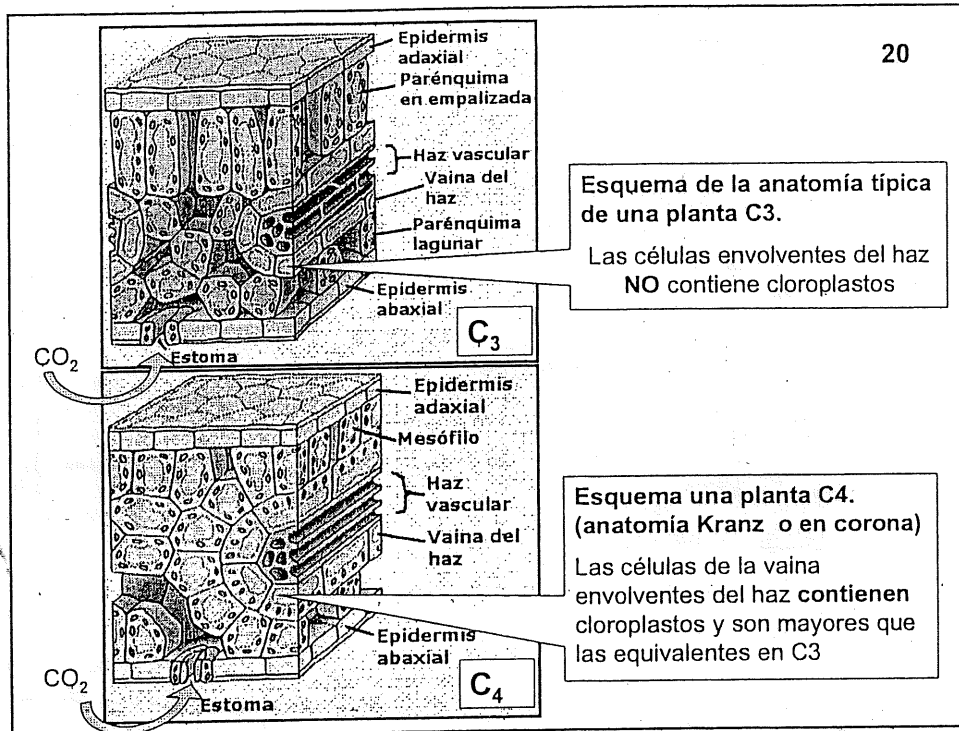
GDP-G $\rightarrow$ Celulosa
ADP-G $\rightarrow$ Almidón

FOTORRESPIRACIÓN

No se genera energía; sino fue se consume.

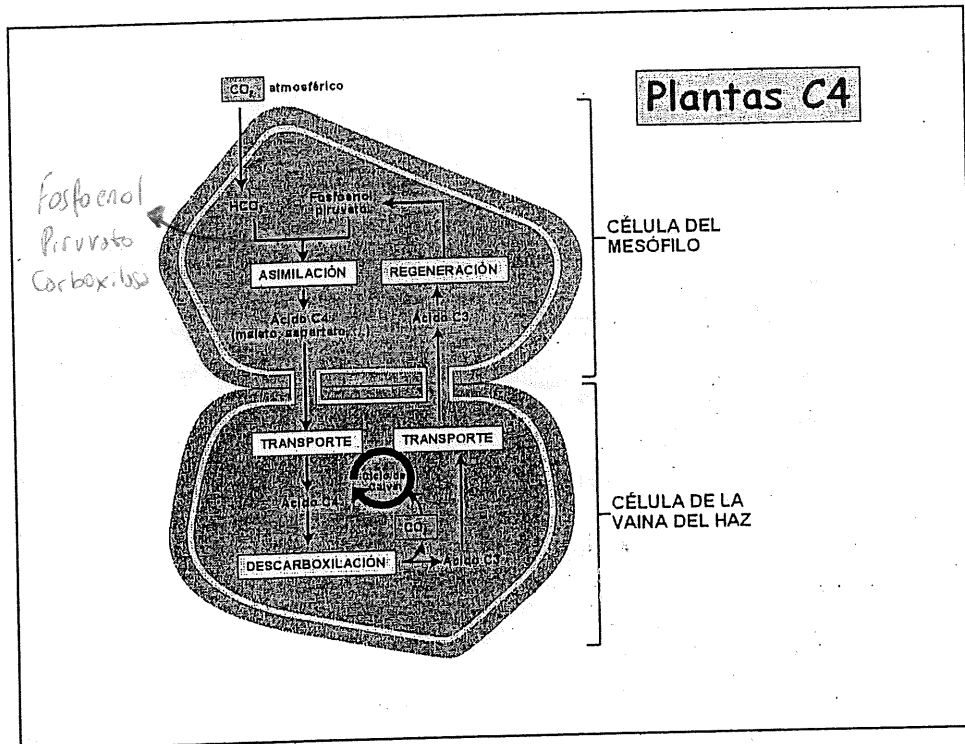


Es C₃ porque el primer producto de la fijación del C es un producto de 3 C, 3-PGlicerato.

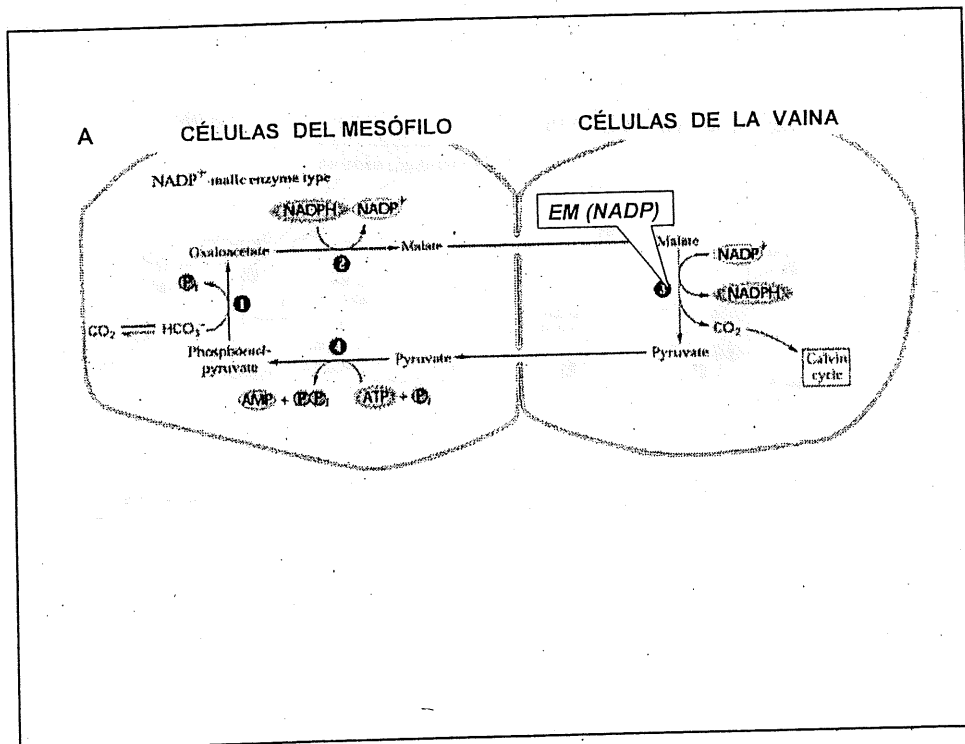


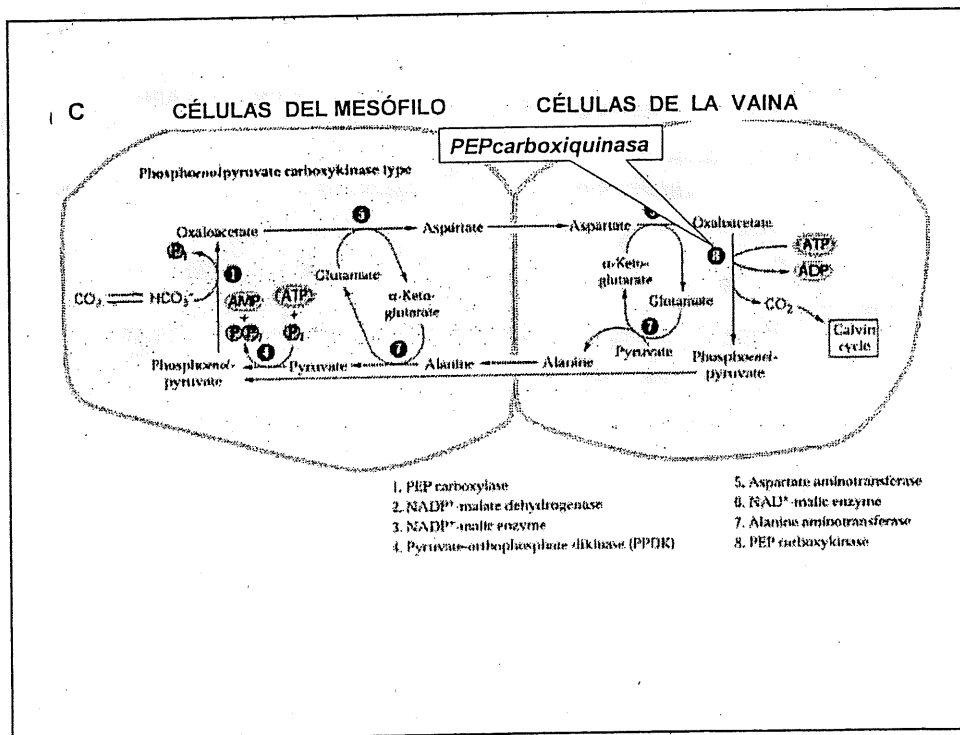
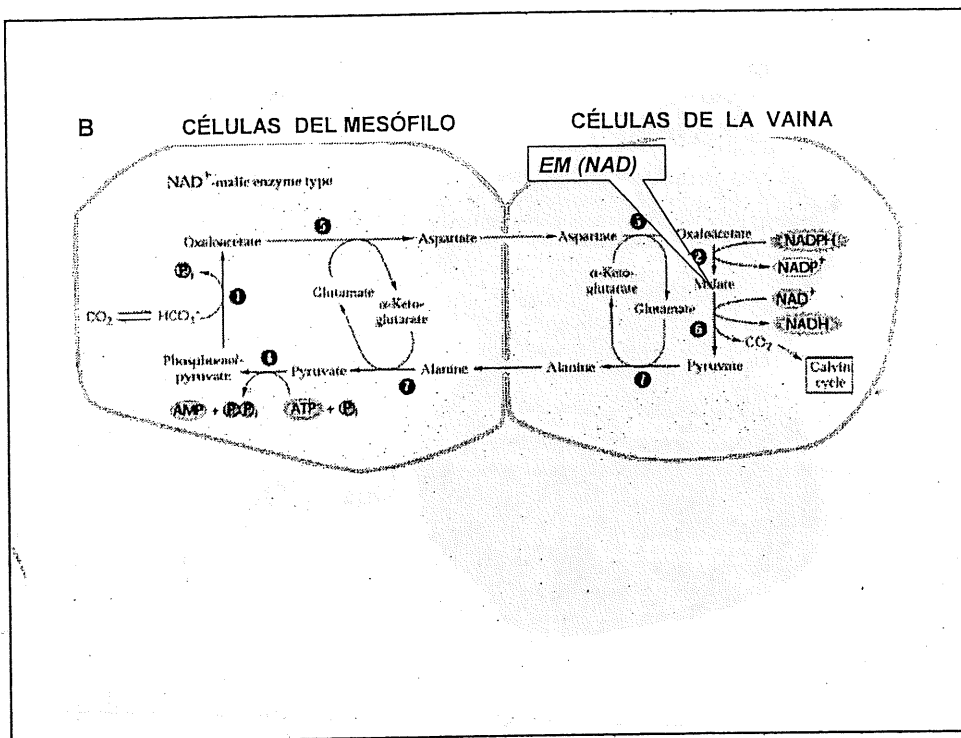
C₄ porque el primer producto de la fijación del CO₂ es de 4C,
~~Phosphoenolpiruvato~~ Molato o Aspartato.

Fosfoenolpiruvato: aceptor de CO_2



Fosfoenolpiruvato:
Aceptor Pimato





Variaciones en la fotosíntesis C_4

Ácido C_4 transportado hacia las células de la vaina del haz	Ácido C_3 transportado desde las células de la vaina del haz	Descarboxilasa	Ejemplos en plantas
Malato	Piruvato	Enzima málica-NADP ⁺	Maíz, caña de azúcar
Aspartato	Alanina	Enzima málica-NAD ⁺	Mijo
Aspartato	Alanina, PEP, o piruvato	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>Panicum maximum</i>

Características de las Plantas C_4

- El CO_2 que fija la enzima RuBisCO en el ciclo de Calvin no procede directamente de la atmósfera sino que ha sido fijado transitoriamente en el mesófilo y vuelve a liberar en las células de la vaina.
- La enzima PEP carboxilasa tiene una gran afinidad por el CO_2 y, por otra parte, no tiene actividad oxigenasa, por lo que el O_2 no interfiere en la fijación.
- El CO_2 captado en el mesófilo y liberado en la vaina resulta mucho más concentrado en ésta que en el tejido fotosintético de las plantas C_3 , compitiendo mejor con el O_2 y favoreciendo la actividad carboxilasa de la RuBisCO.
- Por cada CO_2 fijado, el metabolismo C_4 tiene un mayor coste energético que las C_3 :
 - Las plantas C_4 gastan 5 ATP y 2 NADPH.
 - Las plantas C_3 gastan 3 ATP y 2 NADPH.
- Condiciones ambientales:
 - Plantas C_4 : climas tropicales y subtropicales; relativamente áridos, con iluminación intensa, altas temperaturas y baja humedad relativa.
 - Plantas C_3 : climas templados, temperaturas no muy altas y alta humedad relativa.
- A alta temperatura ($>30^\circ C$) se favorece la actividad oxigenasa de la RuBisCO y, por tanto, las pérdidas por fotorrespiración. Más eficacia en las C_4 .
- Con baja humedad relativa, los estomas tienden a cerrarse, impidiendo el adecuado suministro de CO_2 al interior de las hojas. La menor concentración interna de CO_2 favorece la actividad oxigenasa de la RuBisCO. Las plantas C_4 fijan todo el CO_2 por escaso que sea, con la PEP carboxilasa y luego lo bombean a las células de la vaina del haz.

PLANTAS CAM

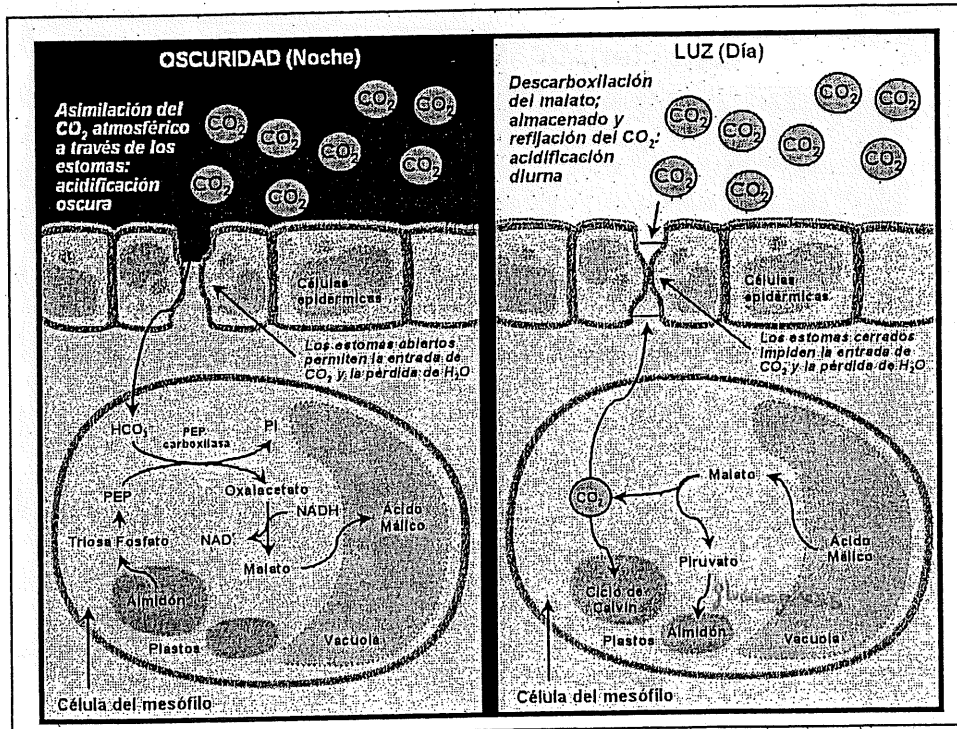
30

Metabolismo Acido de las Crasuláceas

Las plantas de los desiertos cálidos, donde la radiación solar es muy elevada y el agua muy escasa, se presenta un tercer tipo de fotosíntesis: la vía CAM (de metabolismo ácido). Ésta es parecida a la que llevan a cabo las plantas C4 ya que también se forman compuestos de cuatro carbonos que después inician el Ciclo de Calvin, la diferencia estriba que todo el proceso ocurre dentro de las células mesófilas.

Las plantas CAM abren los estomas sólo durante la noche, absorbiendo entonces el CO_2 para convertirlo en malato. Esto permite una menor pérdida de agua. En el día, la planta capta la luz y toma el malato como materia prima para producir moléculas orgánicas.

Como sabemos, el CO_2 capturado de la atmósfera durante la fotosíntesis, regresa a ella mediante la respiración, al fragmentarse los compuestos orgánicos elaborados por las plantas y que sirven de alimento a todos los organismos. Cerrándose así parte del ciclo del carbono en la naturaleza.



NADH
↓
NAD

NADP
↓
NADPH

Características de las Plantas CAM

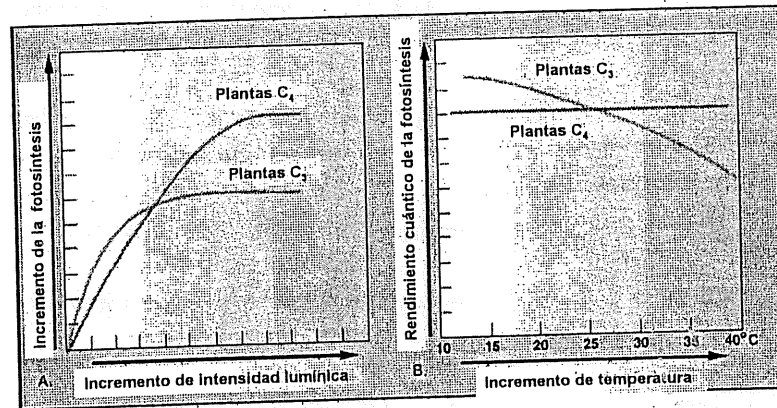
- Plantas que presentan una compartimentalización temporal respecto de la asimilación del CO_2 .
- Propias de climas desérticos o subdesérticos, sometidos a intensa iluminación, altas temperaturas y pronunciados déficits hídricos (condiciones de aridez muy extremas).
- Abren sus estomas por la noche (asimilan el CO_2 atmosférico con la PEP carboxilasa) y los cierran por el día (el CO_2 intracelular se incorpora al ciclo de Calvin) con lo que la actividad carboxilasa de la RuBisCO es máxima.
- Este metabolismo supone un elevado costo energético (mayor que el de las plantas C4) por lo que su rendimiento fotosintético por unidad de tiempo es menor y su crecimiento más lento.
- Es un metabolismo muy adaptado a evitar las pérdidas de agua.

TIPO DE PLANTA Y VARIEDAD	ENERGÍA CONSUMIDA POR MOLÉCULA DE CO_2					
	Mesófilo		Vaina del haz		Total	
	ATP	NADPH	ATP	NADPH	ATP	NADPH
C3	3	2			3	2
C4 (var.1)	2	0	3	2	5	2
C4 (var.2)	2	1	3	1	5	2
C4 (var.3)	3	1	1	1	4	2
CAM (var.1)	6.5	2			6.5	2

	Plantas C3	Plantas C4	Plantas CAM
Anatomía de la hoja:	Células de la vaina del haz sin apenas cloroplastos.	Células de la vaina del haz con grandes cloroplastos.	Células con grandes vacuolas
Carboxilasa Final:	RuBisCO	RuBisCO	RuBisCO
Metabolismo adjunto:	Ninguno	Transferencia CO ₂	Almacenaje de CO ₂
Carboxilasa adjunta:	Ninguna	PEP carboxilasa	PEP carboxilasa
Fotorrespiración:	Alta	Baja	Moderada
Abertura estomática:	Día	Día	Noche
Tipos celulares implicados en el proceso:	1	2	1
Incorporación directa del CO₂	Si	No	No
Gramos de H₂O necesarios para producir 1 g ps	450 a 950	250 a 350	50 a 55
Punto de compensación del CO₂ (ppm)	30-70	0-10	0-5
Temperatura óptima para la fotosíntesis	15-25 °C	30-47 °C	Sobre 35 °C
Ton de ps.ha⁻¹.año⁻¹	20-25	35-40	Baja y variable
Región climática:	Templada	Tropical	Árida

PLANTAS C4		PLANTAS CAM	
Familia	Ejemplos	Familia	Ejemplos
Aizoáceas	Plantas hielo	Agaváceas	Ágaves, yucas
Amarantáceas	Amarantos	Aizoáceas	Plantas hielo
Asteráceas	Margaritas	Asteráceas	Margaritas
Quenopodiáceas	Remolachas	Bromeliáceas	Bromelias
Ciperáceas	Juncos	Cactáceas	Cactus
Euforbiáceas	Euforbias	Crasuláceas	Sedum
Poáceas	Pastos	Cucurbitáceas	Calabacín
Nictangináceas	Bungavillas	Euforbiáceas	Euforbias
		Geraniáceas	Geranios
		Labiadas	Mentha
		Liliáceas	Lirios
		Orquidáceas	Orquídeas
		Oxalidáceas	Oxalis
		Piperáceas	Peperomia
		Vitáceas	Vid

Efectos de la luz y la temperatura en la fotosíntesis de plantas C₃ y C₄



FACTORES QUE AFECTAN LA FOTOSÍNTESIS

EXÓGENOS

- LUZ
- [O₂] y [CO₂]
- TEMPERATURA (se cierran los estomas)
- DISPONIBILIDAD DE AGUA (sin H₂O no hay etipo lúminica)
- DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES

ENDÓGENOS

- TIPO DE PLANTA C₃, C₄, CAM
- DENSIDAD DE ESTOMAS
- AREA FOLIAR
- EDAD
- NIVELES HORMONALES
- OTROS PROCESOS METABÓLICOS CELULARES

FOTOSINTESIS (CUESTIONARIO)

ETAPA LUMÍNICA (REPASO)

- 1) Formule la ecuación fundamental de la fotosíntesis en los vegetales superiores e indique:
 - a) ¿Qué tipo de reacción es desde el punto de vista químico y desde el punto de vista energético?
 - b) ¿Cuáles podrían ser los posibles dadores y aceptores de hidrógeno en bacterias anaeróbicas?
- 2) ¿En qué organela subcelular ocurre la fotosíntesis? Relacione la estructura de dicha organela con la función que cumple.
- 3) ¿Cuántas etapas comprende la fotosíntesis en plantas superiores?
- 4) ¿Qué es un fotón? ¿Qué relación existe entre la energía de un fotón y la longitud de onda?
- 5) Mencione los pigmentos fotosintéticos. Vincule su estructura con la solubilidad.
- 6) ¿Cuál es la estructura química básica de las clorofilas? ¿Qué característica fotoquímica deriva de las diferencias de estructura entre la clorofila a y la b?
- 7) ¿Cuál es la estructura química básica de los carotenoides? ¿Cuál es la zona de su máxima absorción en el espectro lumínico y, por consiguiente, de qué color son?
- 8) ¿Cuál es la función de los pigmentos fotosintéticos? En qué consiste lo que se conoce como efecto protector de los carotenos sobre clorofilas referido a la captación de energía lumínica?
- 9) ¿Cómo están constituidos el fotosistema I (PS I) y el fotosistema II (PS II)? ¿Qué funciones cumplirían el P 700 y el P 680 respectivamente?
- 10) ¿Cómo es el flujo de electrones respecto de los potenciales de oxidorreducción en todo el sistema? ¿A través de qué proceso se reduce NADP?
- 11) ¿Qué función cumple el Fotosistema II (PS II) en el proceso fotoquímico? ¿En qué proceso de la etapa lumínica de la fotosíntesis el Fotosistema II no interviene y por qué?
- 12) ¿Qué es la fotofosforilación?

ETAPA BIOSINTÉTICA

- 13) En el Ciclo de Calvin, ¿cuál es el aceptor primario del CO_2 ? ¿Qué enzima cataliza la reacción?
- 14) ¿En cuáles etapas del Ciclo de Calvin se utiliza el ATP y el NADPH_2 producidos en la etapa lumínica de la fotosíntesis?

15) Las plantas de maíz, sorgo, caña de azúcar, etc., presentan un mecanismo especial de fijación de CO_2

a) ¿Sobre qué molécula se fija el CO_2 atmosférico? (relaciónelo con la anatomía foliar).

¿Cuál es el producto primario de dicha fijación?

b) ¿Cómo continúa el proceso de fijación del CO_2 ?

16) a) ¿Qué es la fotorrespiración? ¿Qué organelas están comprometidas en este fenómeno?

b) ¿Qué actividad tiene la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) o carboxidismutasa en la primera reacción de la fotorrespiración

c) Este fenómeno, ¿sucede o no en las plantas C_4 ? Fundamente.

17) Describa el metabolismo de las plantas CAM (Metabolismo Acido de las Crasuláceas).

18) Indique las reacciones de síntesis de sacarosa a partir de triosa fosfato.

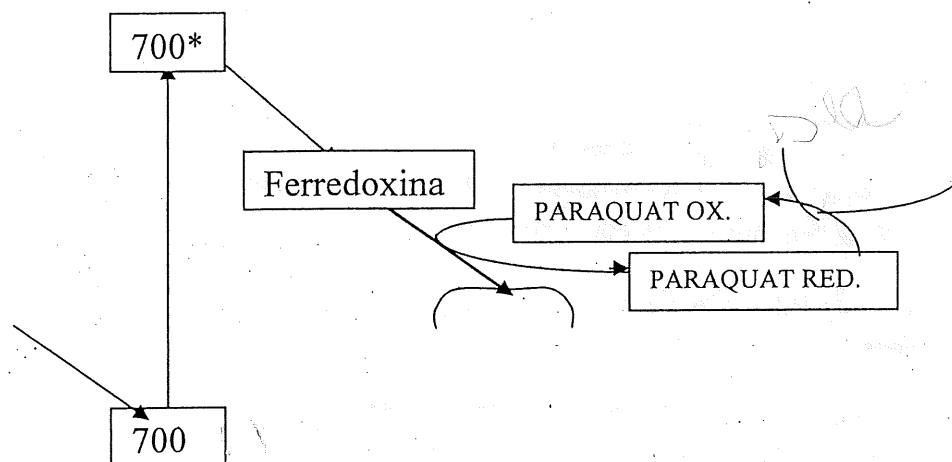
19) Escriba las reacciones de síntesis de almidón en cloroplastos a partir de fructosa-6-fosfato.

20) a) ¿Cuál es el transferidor de restos glucosilos común para la síntesis de almidón, de glucógeno y de celulosa? Indique estructura y características.

b) ¿Cuál es el transferidor de restos glucosilos más eficiente para la síntesis de almidón?

FOTOSÍNTESIS (PROBLEMAS INTEGRADORES)

1) Se ha encontrado que el herbicida Paraquat actúa bloqueando el proceso fotosintético y provocando la desecación o defoliación de las plantas. Dicha interferencia se produce según el siguiente esquema:



a) ¿Supone usted que en presencia de Paraquat el ciclo de Calvin puede producirse normalmente o no? Justifique.

b) ¿Existe desprendimiento de O_2 de los cloroplastos? Fundamente su respuesta.

c) Considerando los valores de potenciales estándar de óxido-reducción del P700 ($E_0 = +0,4V$) y del Paraquat ($E_0 = -0,4V$) explique si el proceso que va desde el P700 al Paraquat es espontáneo o no. Fundamente su respuesta considerando la relación entre G y E (variación del potencial estándar de reducción) según la siguiente ecuación:

$$G = -n.F. E$$

siendo n = número de electrones transferidos y $F = 23,06 \text{ kcal/V.mol}$ (cte. de Faraday). Justifique la ocurrencia de dicho proceso en la naturaleza.

d) En un experimento se prepararon tres tubos según el siguiente esquema:

d.1.) Suspensión de cloroplastos + luz + 2,6-diclorofenolindofenol.

d.2.) Suspensión de cloroplastos + oscuridad + 2,6- diclorofenolindofenol.

d.3.) Suspensión de cloroplastos + luz + Paraquat + 2,6-diclorofenolindofenol.

Indique qué resultados se obtendrán luego de transcurridas 2 horas.

2) Cuando se ilumina una suspensión de algas verdes en ausencia de CO_2 y se incuba luego en la oscuridad con $^{14}CO_2$ se detecta la aparición de glucosa marcada con ^{14}C en un intervalo de tiempo reducido. ¿Cuál es el significado de esta observación con respecto a las fases de la fotosíntesis? ¿Por qué la conversión de a glucosa marcada se interrumpe al cabo de un tiempo breve? Explique con ecuaciones generales.

3) El grado en que está oxidado o reducido un transportador electrónico durante la transferencia de electrones fotosintética puede, a veces, observarse directamente con un espectrofotómetro. Cuando se iluminan cloroplastos con luz de 700 nm, el citocromo f, la plastocianina y la plastoquinona están oxidados. No obstante, cuando se iluminan los cloroplastos con luz de 680 nm, estos transportadores electrónicos están reducidos.

a) Explique este fenómeno.

b) Cuando una planta es iluminada con una combinación de luz de 680 y 700 nm, el ritmo fotosintético (medido por la producción de oxígeno) es mayor que si se la ilumina con cada una de esas longitudes de onda por separado. Explique.

4) Se realizó la siguiente experiencia: se colocaron plantas de maíz (C4) y plantas de trigo (C3), en sus respectivas cámaras, conteniendo una atmósfera controlada y en presencia de luz. En ambas se les inyectó CO₂ radioactivo (marcado con ¹⁴C). Se comprobó que después de aproximadamente 1 segundo, más del 90% de la radioactividad incorporada en las hojas de maíz se encuentra en los átomos de C del malato, aspartato, y oxalacetato, y que sólo después de 60 seg. aparece la marca radioactiva en el C1 del 3-fosfoglicerato. En el caso de la planta de trigo no se detectó la marca radioactiva en compuestos de 4 C en ningún momento, dentro de los primeros 60 seg. Fundamente estos resultados indicando:

a) qué compuesto aparecerá marcado como resultado de la incorporación del ¹⁴CO₂, en las células de la hoja de trigo;

b) cuál es la enzima responsable de la incorporación del mismo inicialmente en plantas de maíz y en el caso del trigo.

Posteriormente se aumentó progresivamente la concentración de O₂ dentro de la cámara en la que se encuentra la planta de trigo, y se verificó un aumento en la concentración de CO₂ dentro de la misma.

c) Explique la razón de dicho aumento en la concentración del CO₂ dentro de la cámara.

d) ¿Qué supone Ud. que pasaría en la cámara que contiene a las plantas de maíz? Justifique.

5) No se conocen herbicidas que interfieran directamente con la reducción del CO₂ a hidratos de carbono, pero casi la mitad de los herbicidas de uso corriente inhiben la fotosíntesis. En presencia de luz, asocie la acción de los siguientes herbicidas con los diferentes tipos de efectos posibles citados más abajo, y explique los mecanismos correspondientes.

Herbicidas:

a) Diurón (compite con la plastoquinona B por su sitio de fijación en el fotosistema II).

b) Perfluidone (agente desacoplante en fotosíntesis). *Permeabiliza la Tilacoidea*

c) Amitrol (inhibidor de la síntesis de carotenos). *sin carotenos se daña la clorofila*

d) Diquat (acepta electrones cedidos por la ferredoxina, y los dona a su vez al oxígeno derivado de la fotólisis del agua, produciendo formas de oxígeno activas).

Posibles Efectos sobre:

a) Fotosensibilización de pigmentos clorofilianos.

b) Desprendimiento de oxígeno.

c) Fotofosforilación.

d) Flujo cíclico de electrones.

e) Formación de 1,3-bisfosfoglicerato en plantas C₄

En el caso de los herbicidas Diquat y Perfluidone, comente además qué etapas del Ciclo de Calvin se verán directamente afectadas y por qué.

6) Cloroplastos aislados de espinaca son ensayados para evaluar su capacidad de fotorreducir al NADP⁺ en un sistema de reacción que contiene ferredoxina. El sistema es iluminado con luz blanca y se obtienen 2,9 µmoles de NADPH. En presencia de inhibidor del PSII en cambio se obtienen 0,5 µmoles de NADPH.

a) ¿Por qué se anula drásticamente la reducción de NADPH en las condiciones descritas?

b) Esquematice el flujo de electrones en la etapa fotoquímica que justifique su respuesta en (a).

c) Formule las reacciones de utilización del NADPH formado por fotosíntesis en la planta.

FOTOSÍNTESIS (TRABAJO PRÁCTICO EXPERIMENTAL)

FOTOSÍNTESIS: REACCIÓN DE HILL

ACCIÓN DE UN HERBICIDA SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA

I - INTRODUCCIÓN:

El presente trabajo práctico tiene como fundamento la reacción de Hill. En 1939 Robert Hill demostró que un preparado de cloroplastos aislados, en presencia de luz y de un conveniente aceptor de electrones (como por ejemplo ferricianuro) y en ausencia de dióxido de carbono, es capaz de desprender oxígeno, así como de reducir el ferricianuro a ferrocianuro.

Este descubrimiento de Hill constituyó un hito en el proceso de determinación del mecanismo fotosintético, puesto que:

1ro: Fracciona la fotosíntesis en dos fases, mostrando que la liberación de O_2 puede realizarse sin la reducción del CO_2 , el cual puede sustituirse por aceptores de electrones artificiales tales como el ferricianuro.

2do: Confirma que el oxígeno producido proviene del agua y no del CO_2 , puesto que éste no está presente.

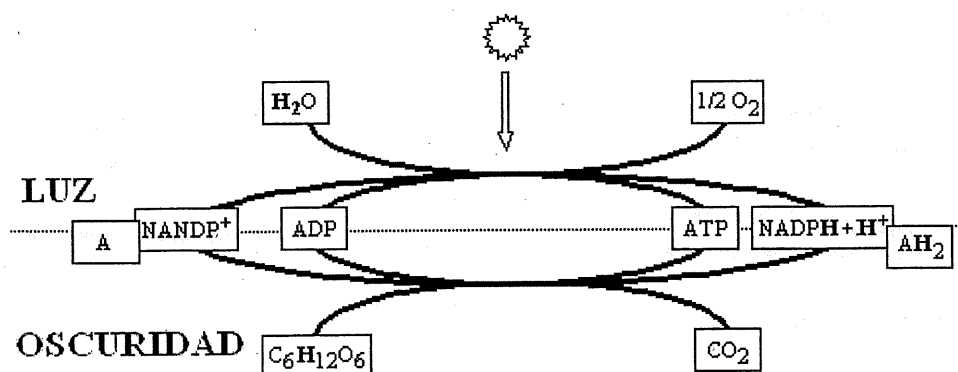
3ro: Demuestra que los cloroplastos aislados pueden realizar una parte significativa del proceso fotosintético.

4to: Revela que un hecho primario en la fotosíntesis *es la transferencia activada por la luz de un electrón desde una sustancia a otra contra un gradiente de potencial químico*. La reducción del ión Fe^{+3} del ferricianuro a Fe^{+2} del ferrocianuro por la acción de la luz es una transferencia de energía lumínica a energía química.

La reacción de Hill presenta la siguiente formulación: $2 H_2O + 2A \longrightarrow 2 AH_2 + O_2$

donde el aceptor de electrones A es el llamado reactivo de Hill el cual puede ser ferricianuro o colorantes reducibles como por ejemplo 2,6 diclorofenol-indofenol.

Si representamos las fases lumínica y oscura de la fotosíntesis con el siguiente esquema:



El reactivo de Hill (A) está reemplazando al $NADP^+$ presente en la fase lumínica como aceptor de los H que provienen del H_2O y actuaría a nivel de la filoquinona en el Fotosistema I

No vamos a hacer lo que hizo Hill.
El NADP es el aceptor de e⁻.

II - MATERIALES :

a) Muestra biológica:

Hojas frescas de espinaca (*Spinacea oleracea* L.)

b) Reactivos:

1- Solución buffer fosfato 0,1M pH 6,8 con sacarosa 0,34M y KCl 0,01M

Fosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)		9,09 g
Fosfato monosódico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)		6,76 g
Cloruro de potasio (KCl)		0,74 g
Sacarosa		116,3 g
Agua destilada csp		1000 ml

Sacarosa
Sirve para que
la sol. sea isotónica

Ajustar a pH 6,8 con HCl o NaOH. Conservar en heladera.

2- Solución de 2,6 di clorofenol-indofenol 1,2 mM

2,6 di clorofenolindofenol		39,1 mg
Alcohol etílico		10-20 ml
Agua destilada csp		100 ml

3- Suspensión de herbicida preeemergente

Suspensión comercial (*)		1 ml
Agua destilada csp		100 ml

(*) Nombre común: Diurón.

Nomenclatura química: 3-(3,4 diclorofenil)-1,1-diurea (DCMU).

Interfiere la reacción de Hill, captando los electrones que deberían pasar del fotosistema II (fase activada) a la plastoquinona de la cadena transportadora de electrones que va al fotosistema I.

c) Material de laboratorio:

Hielo picado
Mortero
Embudo y tela filtrante
Vaso de precipitados
Gradilla con tubos de ensayo
Papel de aluminio
Lámpara de 100 watts

III - TÉCNICA:

Se cortan con sacabocados 10 pequeñas porciones (aprox. 1cm de diámetro) de hojas de espinaca, (*Spinacia oleracea* L.) o acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) evitando la nervadura media. Las mismas se colocarán en un mortero previamente enfriado 10 minutos sobre hielo picado.

Una vez enfriado el material, se realiza una extracción malaxando durante 2 minutos con 10ml de la solución reguladora (buffer fosfato-sacarosa-cloruro de potasio) previamente enfriada en

Por el buffer es importante el pH que es de 8, aproximadamente.

La isotonicidad del medio garantiza que ⁹³ no se rompa el cloroplasto.

heladera. se filtra por tela. Se lava el material remanente en el mortero con otros 15 ml de solución reguladora que se filtra nuevamente. A partir de todo el volumen filtrado se distribuyen alícuotas de suspensión de cloroplastos para su posterior tratamiento según el siguiente esquema:

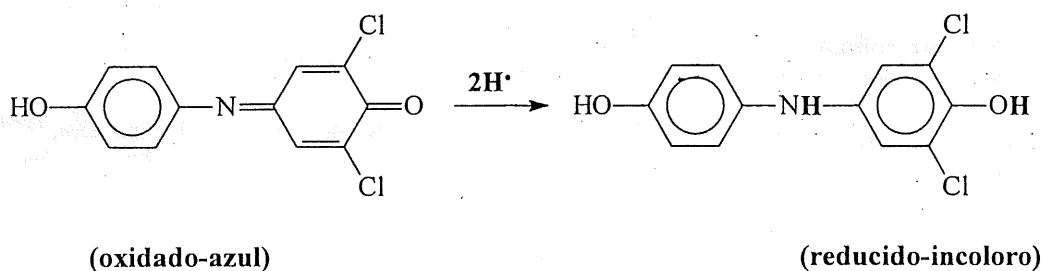
Desnaturalizado No en luz

Número de tubo de ensayo	1	2	3	4
Suspensión de cloroplastos (ml)	5	5	5	5
Sc. 2,6 diclorofenol'indofenol (gotas)	10 5	5	5	5
Tratamiento ensayado	Tubo con suspensión de cloroplastos	Tubo c/ susp. de cloroplastos previamente hervida y enfriada	Tubo c/ susp. de cloroplastos cubierto con papel de aluminio	Tubo c/ susp. de cloroplastos + herbicida
Emulsión DCMU* (gotas)	-	-	-	3
Coloración inicial	azul	azul	azul	azul
Exponer la gradilla con todos los tubos a una fuente cercana de luz incandescente por 10 minutos				
Coloración final	Verde	azul	azul	azul

* Herbicida preemergente no selectivo. Nomenclatura química: 3-(3,4 diclorofenil)-1,1-dimetilurea. Nombre comercial: Diurón. Interfiere la reacción de Hill,, captando los electrones que deberían pasar del fotosistema II (fase activada) a la plastoquinona de la cadena transportadora de electrones que va al fotosistema I.

* *Además PSII no hay transporte de e⁻. No permite que se reduzcan los otros elementos de la cadena. Es un Inhibidor que impide la síntesis de NADPH.*

Reacción del 2,6 di clorofenol-indofenol (reactivo de Hill): *El herbicida afecta la etapa bioquímica*



IV- RESUMEN Y CONCLUSIONES:

Exponga los objetivos de este trabajo práctico, las observaciones realizadas y las causas de los fenómenos observados. Realice un esquema Z para indicar el sitio de acción del reactivo de Hill y del herbicida.

Objetivos:

TEMA 7 : METABOLISMO DEL NITRÓGENO

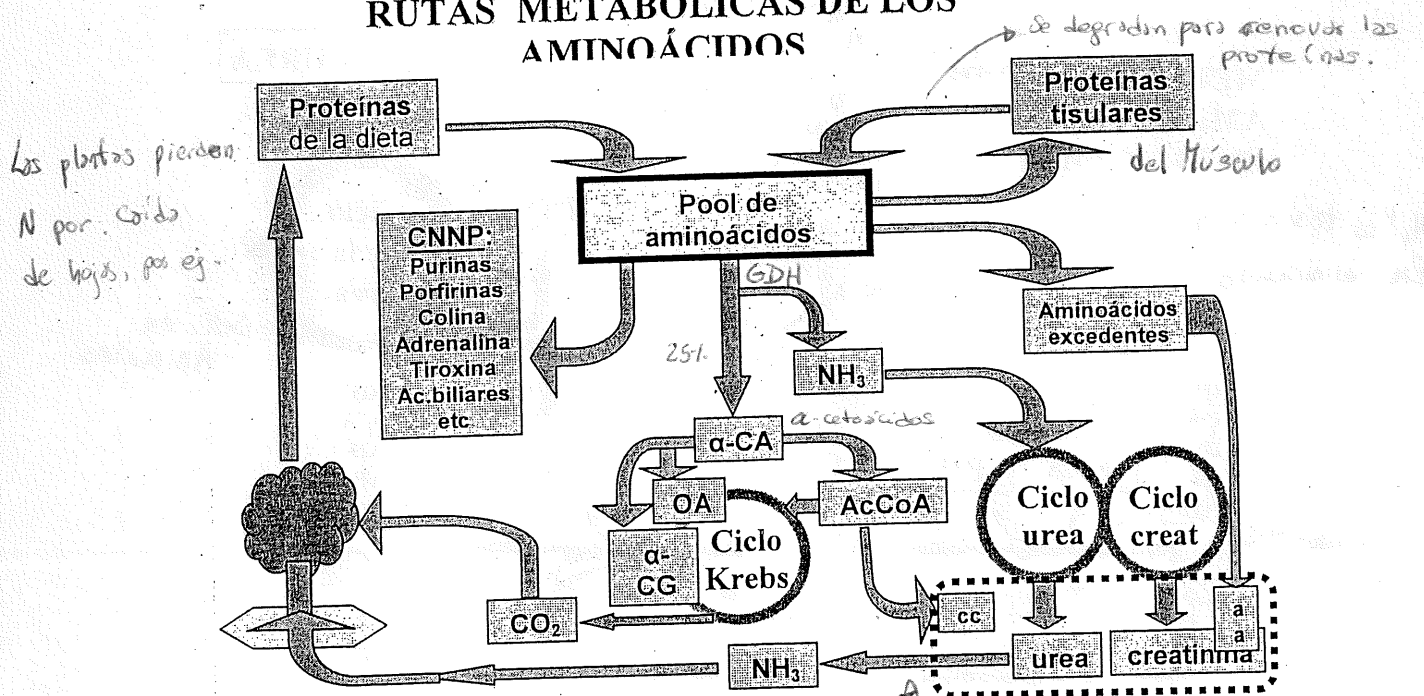
ESQUEMAS

CONTENIDOS

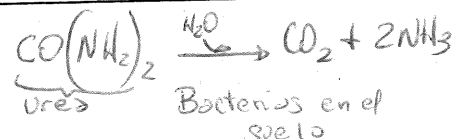
- RUTAS METABÓLICAS DE LA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS (destino del grupo amino y de la cadena hidrocarbonada)
- TRANSAMINACIÓN OXIDATIVA Y DESAMINACIÓN
- CICLO DE LA UREA
- CICLO DEL NITRÓGENO
- ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN LOS VEGETALES
- FIJACIÓN DE NITRÓGENO
- ACTIVIDAD NITROGENASA

CNNP: Compuestos Nitrogenados No proteicos.

RUTAS METABÓLICAS DE LOS AMINOÁCIDOS



Balace del N = N ingerido - N excretado



La puede ser positivo cuando hay crecimiento.
El balance puede ser 0, también.
También negativo, por ejemplo, por ejemplo.

con actividad
Ureolíticas

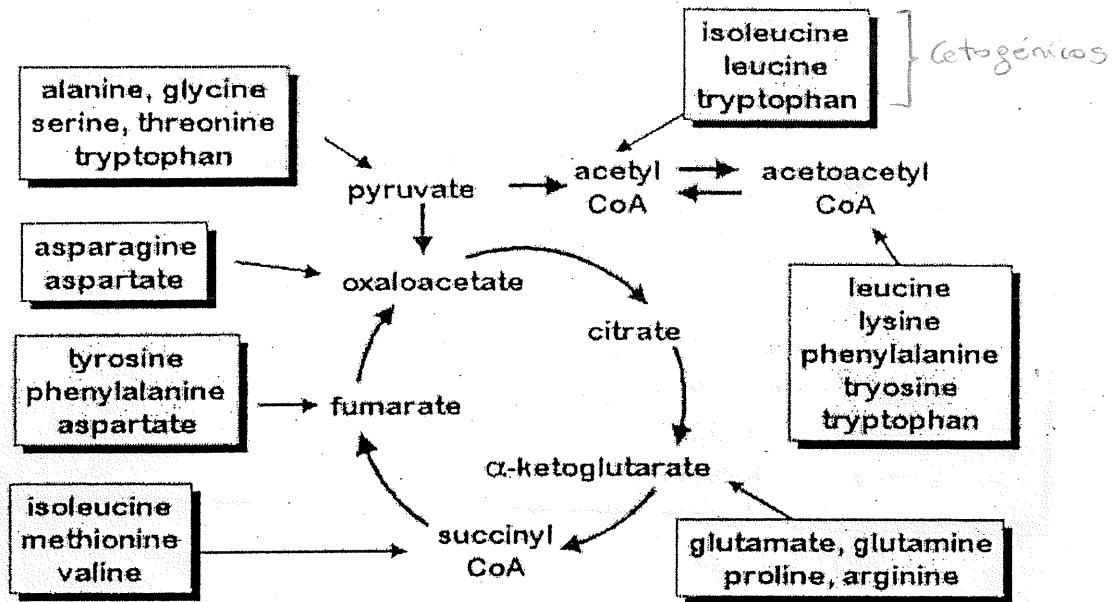
Ureotelicos => animales

Amonotelicos => Peces

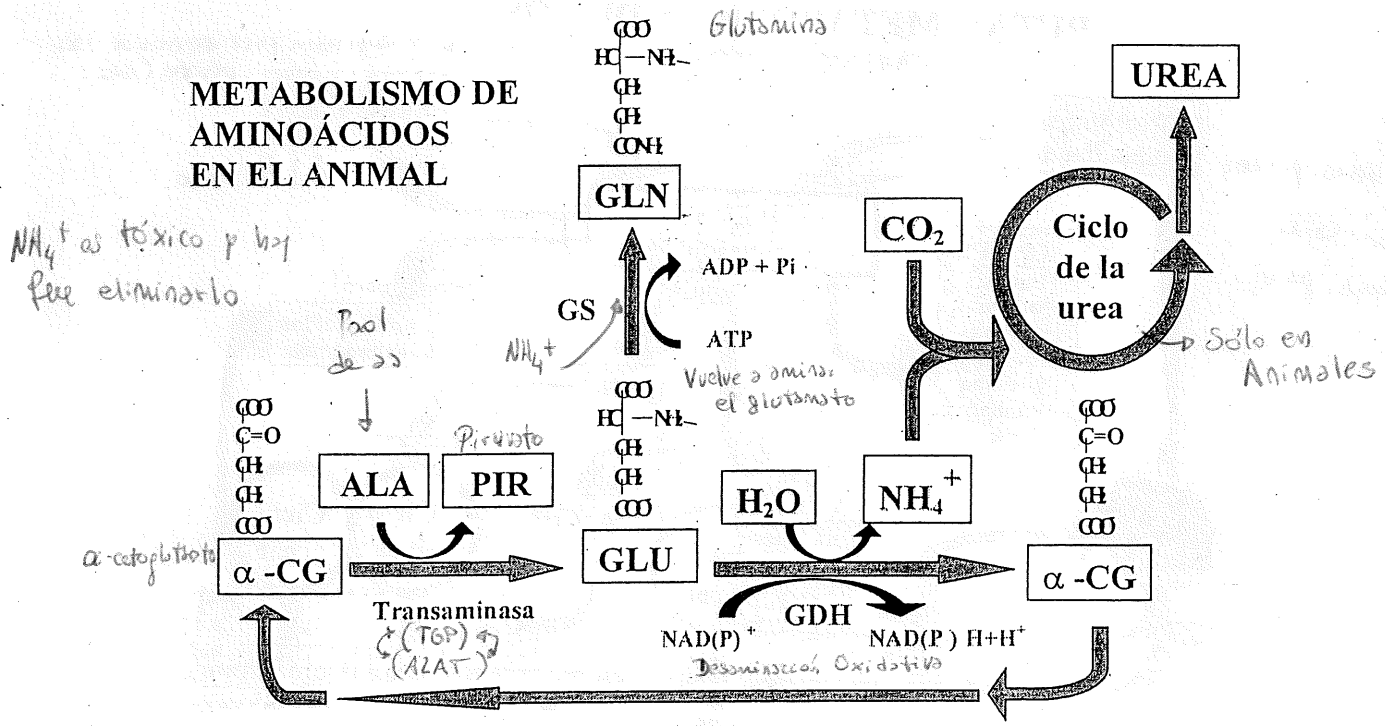
Uricotelicos => lo eliminan por
Acido Urico. Aves y Reptiles

C.C.: Cuerpos Cetónicos

DESTINO DE LAS CADENAS HIDROCARBONADAS



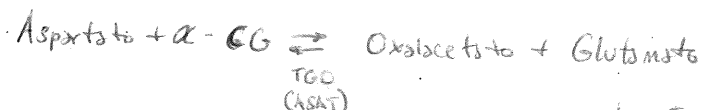
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN EL ANIMAL



Transaminación: el grupo ceto de un cetósido (como α-cetoglutarato) se cambia por el amino de un a.a.

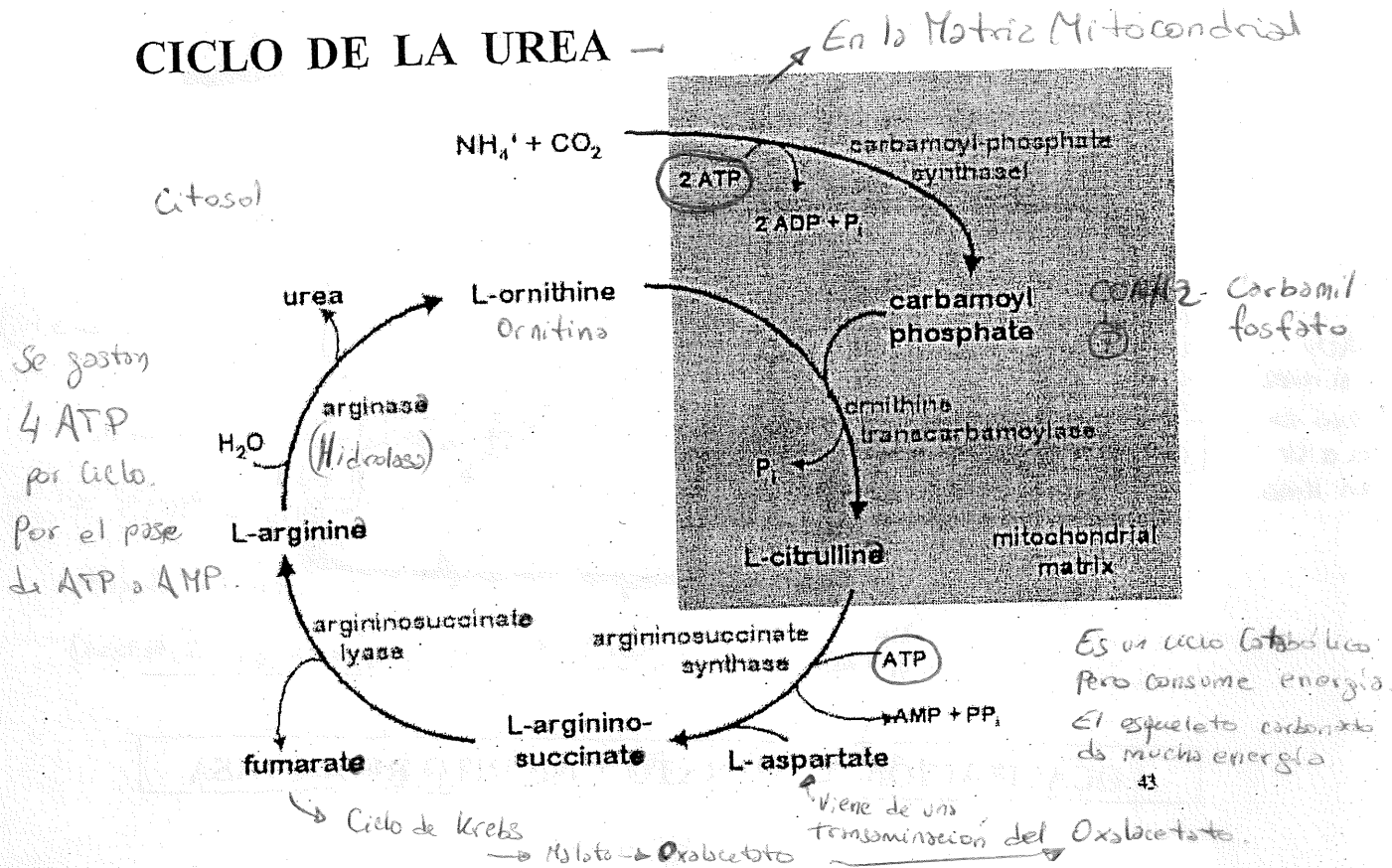


Todos los a.a. se convierten Glutamato y se usa la Glutamato Deshidrogenasa (GDH)

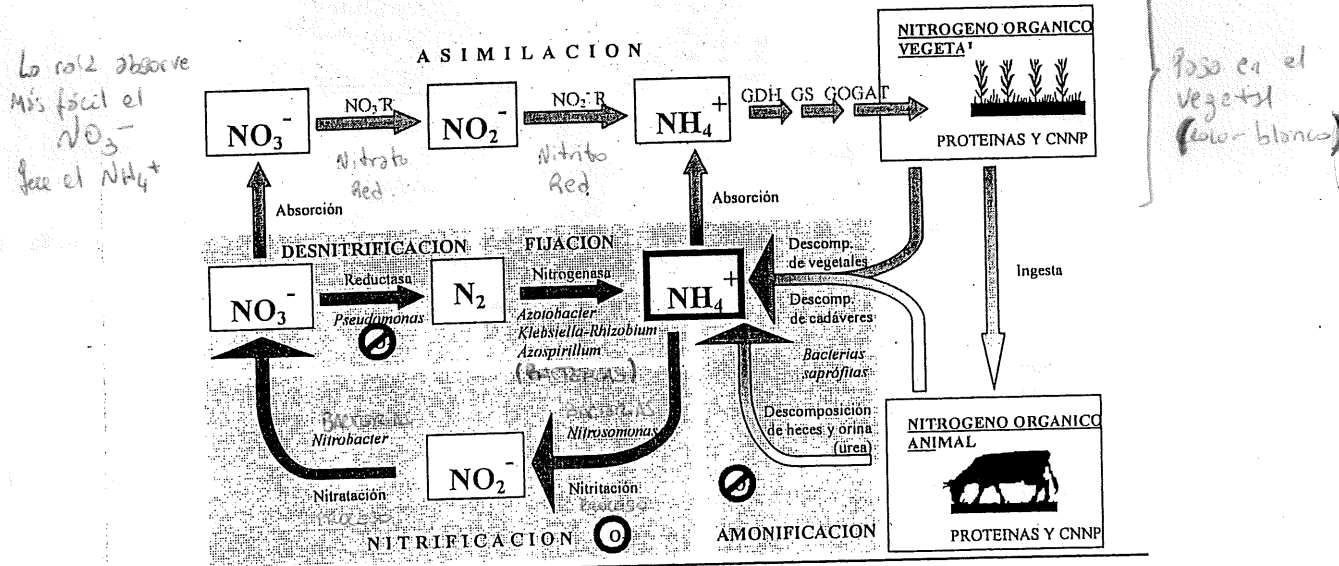


Los Transaminasas actúan como vitaminas como B6, que es una Coenzima

CICLO DE LA UREA



CICLO DEL NITROGENO



GOGAT: enzima de las plantas.

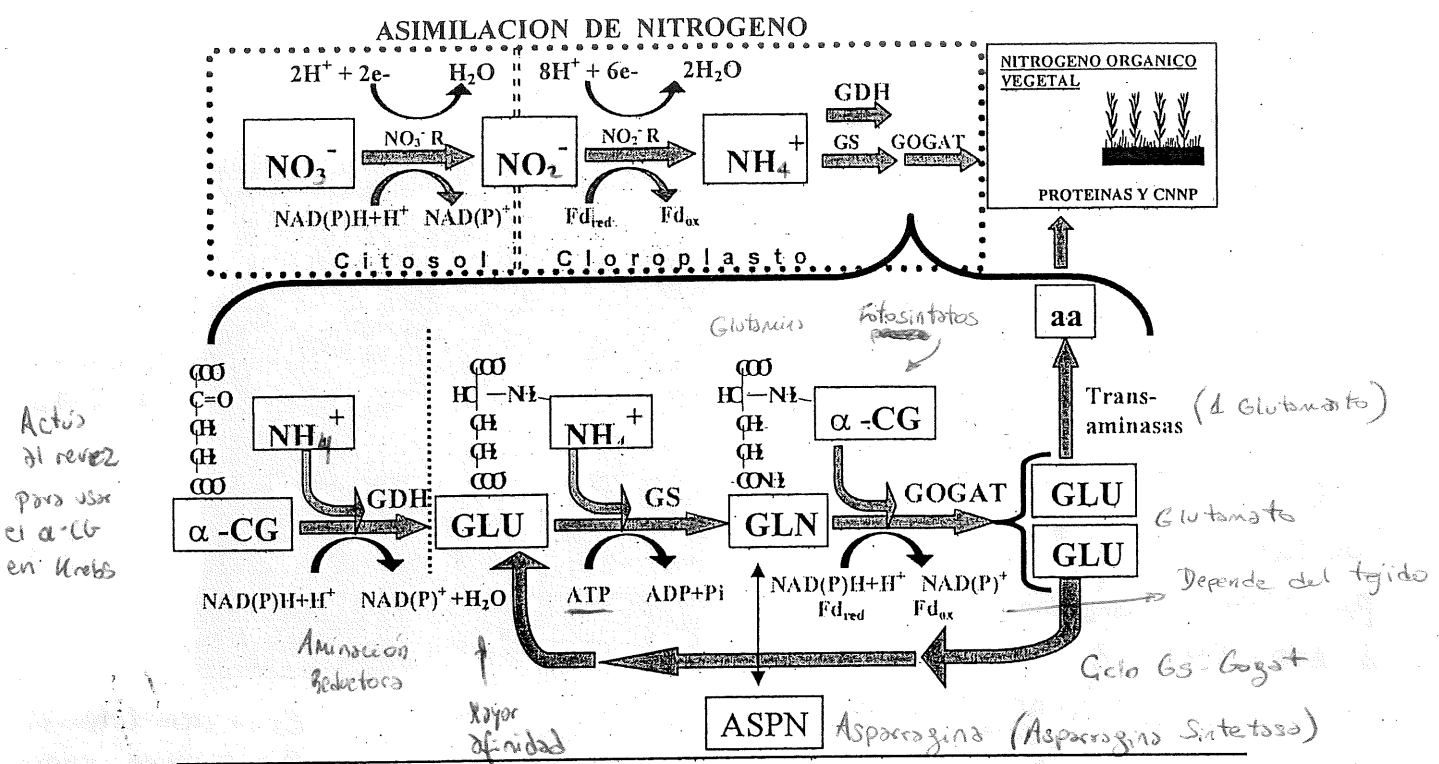
Amonificación: desaminación de a.a. En condiciones O_2 .

Dependiendo del O_2 actuarán ciertas bacterias.

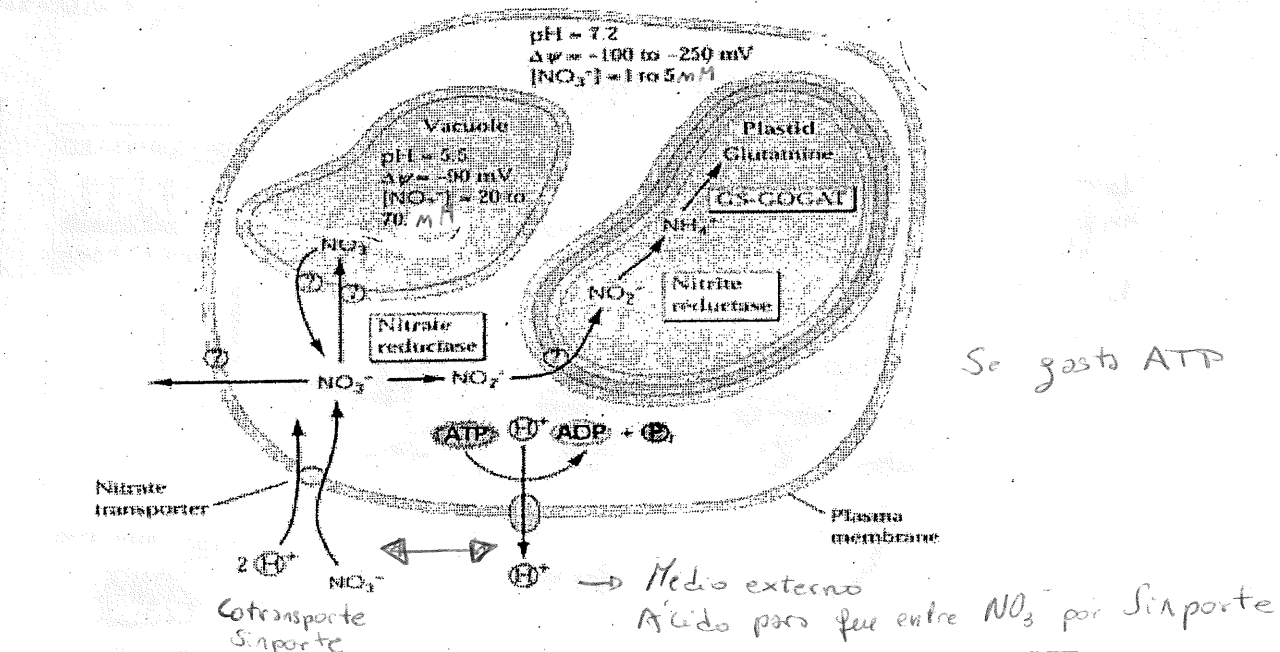
Desnitrificación: cuando no hay O_2 , como en suelos inundados.

GS: Glutamina Sintasa

GS II: Fotosintética
GS I: No Fotosintética (en la raíz)



LOCALIZACIÓN DE NITRATO Y NITRITO REDUCTASA



En la oscuridad se reserva el NO_3^- en la Vacuola.

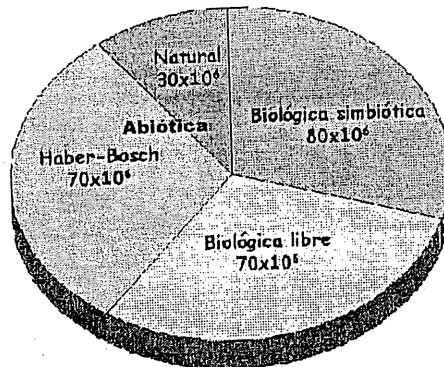
Regulación de la NO_3^- Reductasa:

- (+) Luz, NO_3^- , Glucidos
- (-) Glutamina
- (-) Desactivado por fosforilación

↳ Fd_{ox} viene de fotosíntesis, pero en tejidos no fotosintéticos viene gracias a la oxidación del NADP (que viene de la Vía de las Pentosas Fosfatos; porque el tejido no es fotosintético) y reduce a la Ferredoxina para que sea usada por la NO₂⁻ Reductasa.

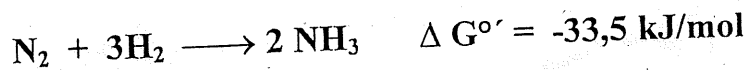
FIJACIÓN DE NITRÓGENO

Reducción del Nitrito
a Amonio



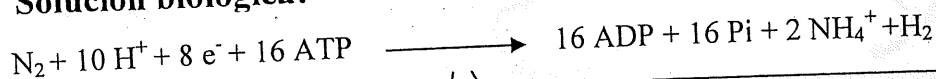
N₂ fijado anualmente 250x10⁶ T
N₂ incorporado a la biomasa 310 x 10⁷ T

FIJACION DE NITROGENO



N≡N Energía de activación muy elevada ⇒ dificultad cinética

Solución biológica: lo hacen las plantas.



Nitrogenasa

Fd = Ferredoxina = Fe-S-Prot

DNR = Dinitrogenasa Reductasa

DN = Dinitrogenasa

Subunidades

Nitrogenasa, características:

• Formada por dos Sist. Proteicos

• Destruída por O₂

• Contiene átomos de metales de transición, Fe y Mo

• Necesita Mg²⁺ para su activación

• Es inhibido por ADP

• Reduce N₂ y moléculas pequeñas con enlace triple

• Reduce H⁺ a H₂, incluso en presencia de N₂

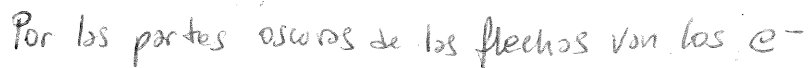
• Presente en Bacterias del Suelo o en Nódulos de Plantas como leguminosas, por simbiosis con bacterias.

Componente I (Nitrogenasa propiamente dicha)
Mo-Fe-proteínas

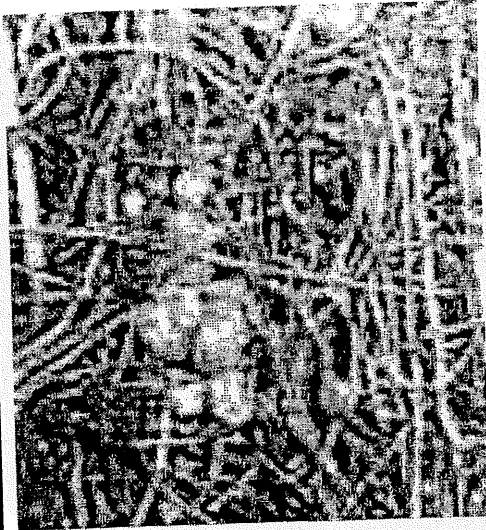
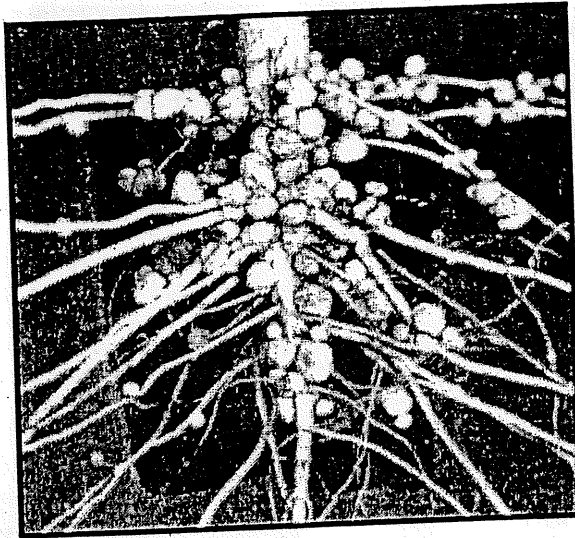
Componente II (Nitrogenasa Reductasa)
Fe-Proteínas

(-) O₂ y NO₃⁻

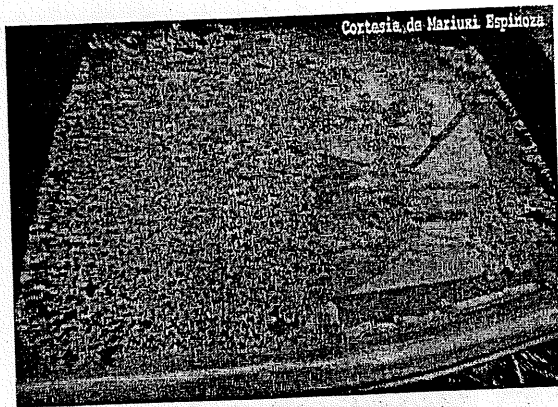
- Fuerte agente reductor proveedor de electrones
- Fuente de ATP
- Proteína transportadora de electrones (que se comporte como poderoso reductante)
- Proteína Mo-Fe : (Dinitrogenoreductasa)
- Proteína Fe-S (no hémica)
- Aceptor final como N_2



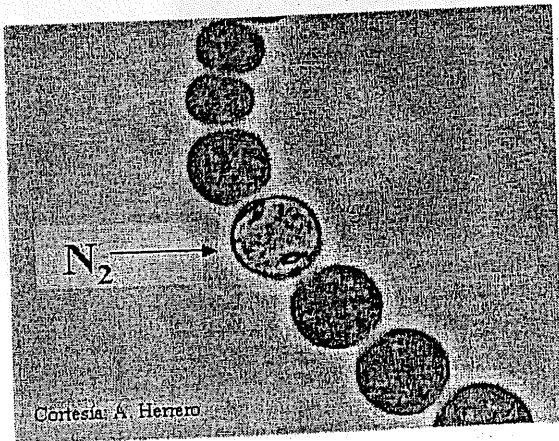
↑ Disponibilidad de NH_4^+ , $\text{NO}_3^- \Rightarrow \downarrow$ Cont. de Nódulos



Nódulos en leguminosas



Anabaena Azollae



Se pueden apreciar los heteroquistes donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Se diferencian de las células vegetativas en su pared engrosada para dificultar la difusión del oxígeno y en la falta de fotosistema II. De esta forma se crea el ambiente anaerobio adecuado para la reducción del N_2 .

Operación conjunta en la Fijación del N_2 .

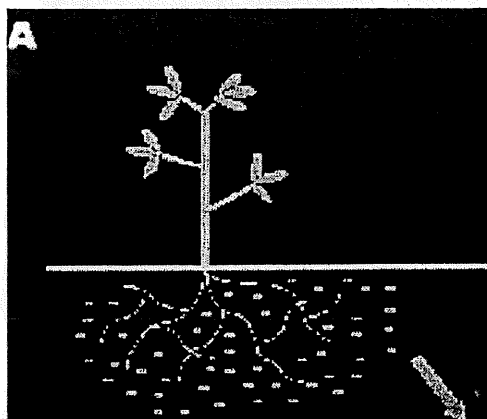
3 Fases:

1- Reconocimiento Celular

2- Infección

3- Establecimiento de la Simbiosis Dicotrofa (Simbiosoma).

Fig.7. Secuencia de la infección de una raíz de leguminosa por *Rhizobium*



Rhizobium presente en el suelo es atraído por la raíz a la que se adhiere, principalmente en el extremo de los pelos radicales, y determina su modificación, gracias a los LCO producidos, dando lugar a una curvatura de hasta 360° que engloba algunas bacterias. En este microespacio erosionan la pared celular y forman el cordón de infección a través del cual *Rhizobium* se dirige a las células del cortex de las capas más inferiores que se han dividido y van a servir para albergar las bacterias liberadas de dicho cordón. La proliferación celular determina la formación de un nódulo, como los expuestos en la Fig. 5, con un interior perfectamente organizado.



→ Cordón de Infección

La raíz de
señales
químicas
por producción
de ácidos,
así atraen
a *Rhizobium*.

Se unen a
los pelos
radicales.

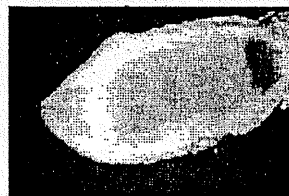
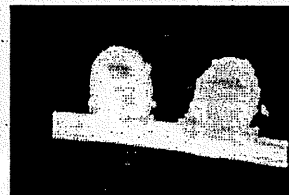
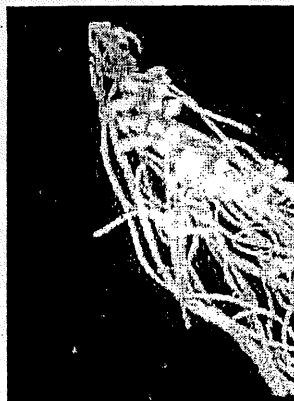
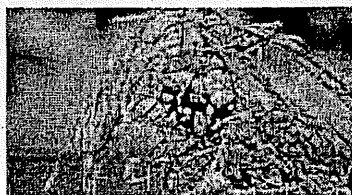
La bacteria
sintetiza
hormonas
para formar el
Nódulo.

Rhizobium: género de bacterias que se relacionan con leguminosas.

Libre no fija N_2 , sino que lo hace cuando está en la planta.

La Nitrogenasa no está presente en estado libre, sino cuando hay simbiosis.

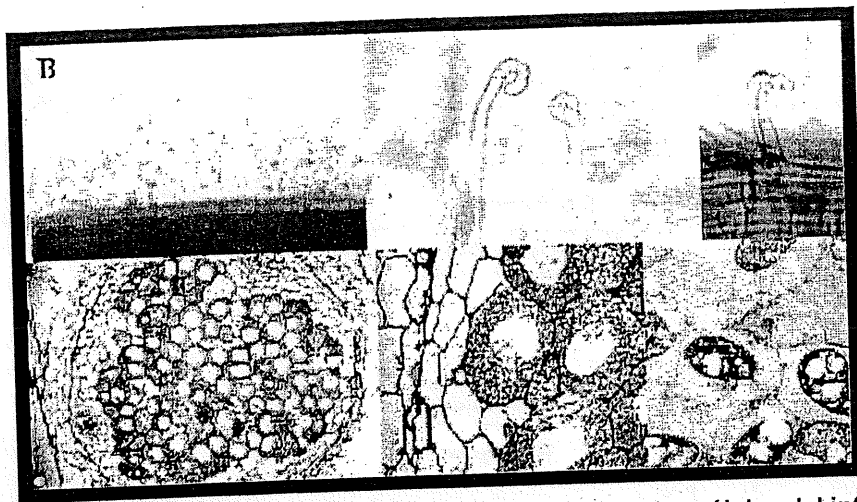
Fig 5 - Nódulos de diferentes leguminosas.



Nódulos de diferentes leguminosas. Dentro de los dos tipos de nódulos que se forman en las raíces de las leguminosas, determinados o indeterminados, de acuerdo con la disposición del meristemo, su tamaño es variable, oscilando entre 0,5 mm y 2 cm, según la especie vegetal de que se trate. En la parte derecha de la foto se presentan nodulos formados por bacterias que llevan un gen informador para detectar su expresión. Se pueden apreciar claramente dentro de los nódulos diferentes zonas de expresión. Se pueden reconocer a grosso modo en cada nódulo tres zonas de las cuales la central corresponde a la que contiene bacteroides activos, la apical, meristemática, y la basal, de senescencia. Un corte transversal de esta zona se presenta en la Fig. 8.

2 Tipos de Nódulo: 1- Crecimiento Determinado (clima Tropical y Subtropical)
2- Crecimiento Indeterminado (clima templado).

En la Simbiosis, las bacterias se convierten en Bacteroides que tienen la enzima Nitrogenasa.



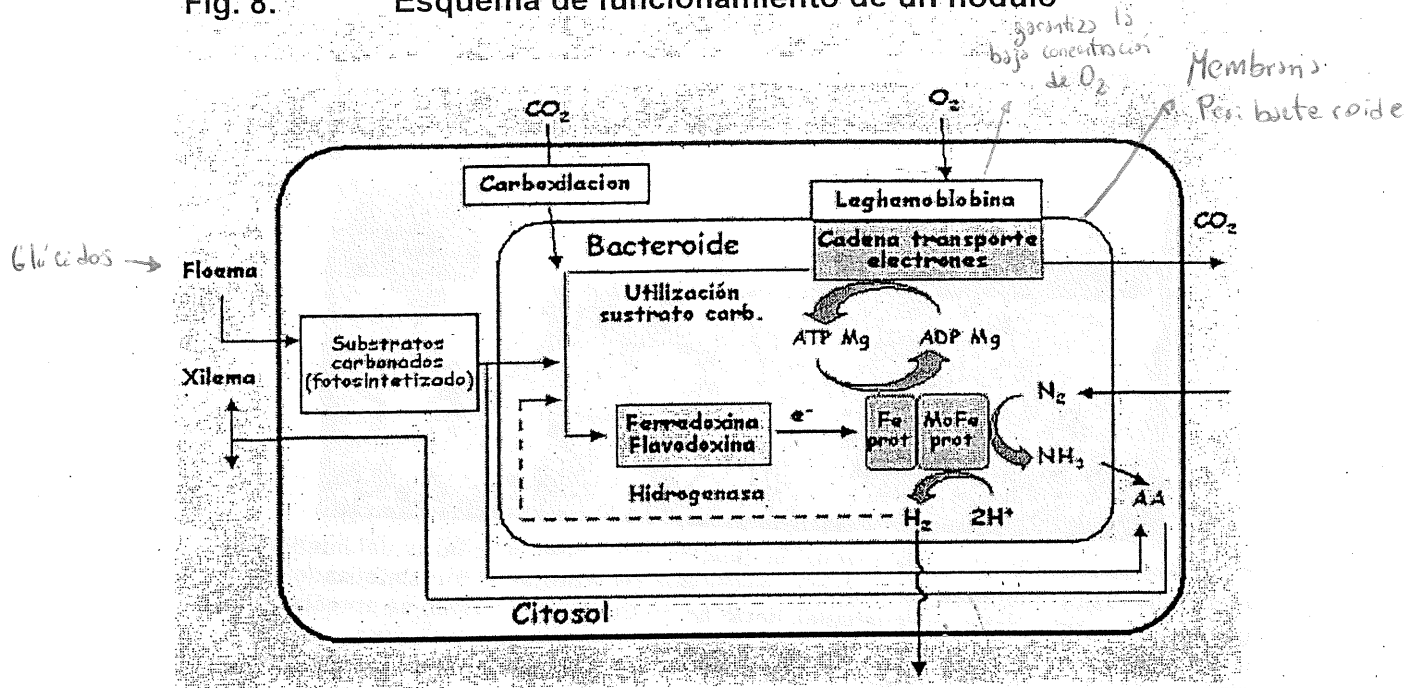
En la microfotografía del corte nodular se pueden reconocer las células del interior del nódulo llenas de bacterias así como los vasos que transportan el fotosintetizado hacia dentro y los compuestos nitrogenados hacia fuera. Con más aumento se aprecian los bacteroides rodeados por una membrana formando lo que se conoce como simbiosoma. Esta forma microbiana es terminal y está especializada en reducir N_2 y transferirlo a la célula hospedadora.



Pelo radical de una planta de guisante inoculada con una cepa de *R. leguminosarum* bv. *viciae* marcada con GFP. Se puede apreciar la fluorescencia verde a lo largo del filamento de infección (cortesía de Ildefonso Bonilla)

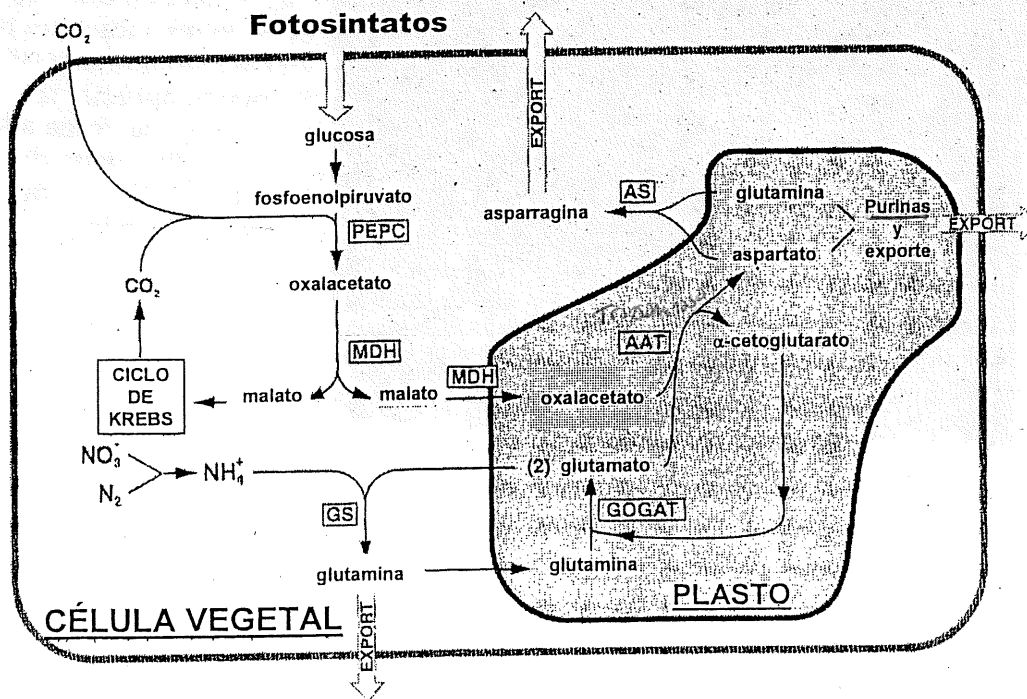
Operación Nif: encargado de sintetizar y regular la Nitrogenasa.

Fig. 8. Esquema de funcionamiento de un nódulo



Sólo cuando está el bacteroide se sintetiza la leghemoglobina

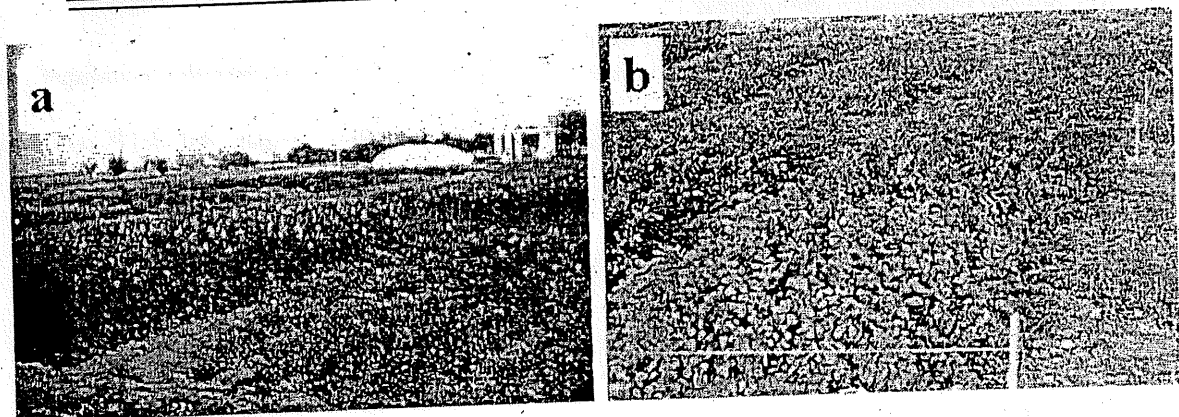
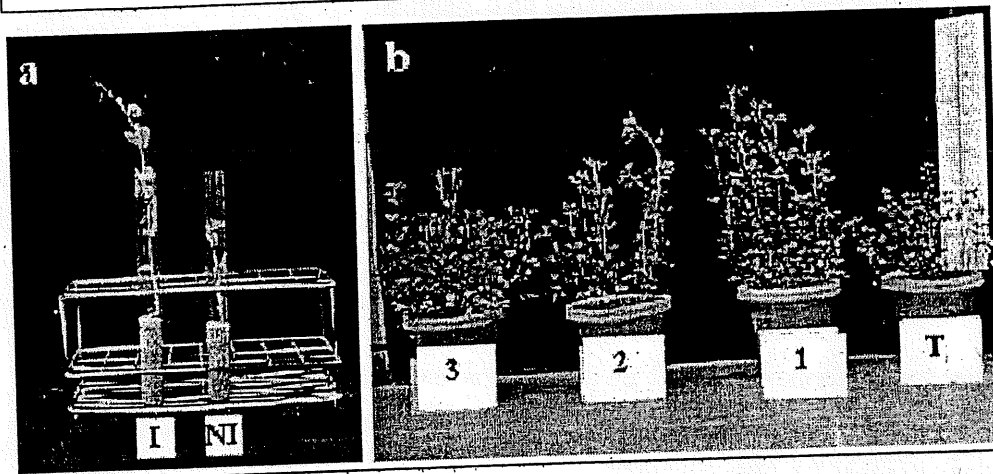
ESQUEMA DE LA ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO EN PLANTAS SUPERIORES



AAT: Aspartato Amino Transferasa

Simbiosoma: Bacteria + Membranas
 La Bacteria crece en forma engrosada y forma un nódulo.

Fig.11 Ejemplos de biofertilización



Ejemplo de biofertilización. a) Plantas de altramuz inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. *Lupinus* rodean una parcela control, sin inocular (cortesía de F. Temprano). b) Zulla (*Hedysarum coronarium*) inoculada con *Rhizobium* sp. *Hedysarum* y parcelas control, no inoculadas (cortesía de J.M. Barea).

Cianobacterias: pueden reducir por sí solas. Heterocistos son células con pared engrosada por que no difunde el N_2 . No tienen fotosistema II, pero hacen foto fosforilación cíclica.
 Hacen fotosíntesis

En plantas (3) (como Cereales) no hay nódulos, hay asociaciones con bacterias *Azospirillum*.

METABOLISMO DEL NITROGENO (CUESTIONARIO)

- 1) a) Mencione las reacciones generales del metabolismo de los α -aminoácidos.
b) ¿Que tipos de desaminaciones de aminoácidos pueden producirse?
c) ¿Qué desaminaciones oxidativas conoce?. Comente las diferentes enzimas y/o coenzimas intervinientes en los distintos tipos de desaminaciones oxidativas.
d) Formule ejemplos de desaminaciones oxidativas indicando si son o no reversibles.
e) Formule tres ejemplos de desaminaciones no oxidativas.
- 2) ¿Qué son las transaminaciones? Defina con una ecuación general. Indique si son o no reacciones reversibles y dé ejemplos.
- 3) Esquematice el proceso de descarboxilación de aminoácidos mediante una ecuación general. Indique cuál es la enzima que interviene, y la reversibilidad o no de la reacción. Dé ejemplos.
- 4) Ejemplifique las reacciones de amidación y desamidación de aminoácidos, indicando ecuaciones y su reversibilidad.
- 5) ¿Cuáles son las formas de excreción de nitrógeno en los organismos animales: peces, mamíferos y aves? Fundamente las diferencias entre las mismas.
- 6) Considerando el ciclo de la urea:
 - a) Indique la localización subcelular del mismo.
 - b) Escriba la reacción de síntesis del carbamil-fosfato (o fosfato de carbamilo) e indique su importancia.
 - c) La síntesis de urea es un proceso endergónico. Explique el origen del ATP requerido relacionándolo con el Ciclo de Krebs.

CICLO DEL NITROGENO EN LA BIOSFERA

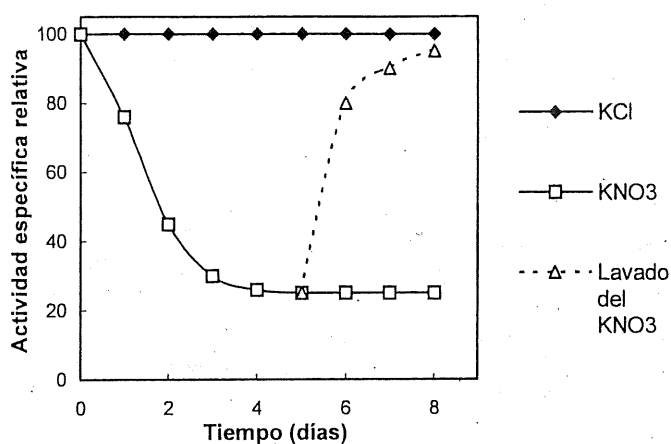
- 1) Esquematice el Ciclo del Nitrógeno mencionando como se denominan los procesos bióticos y abióticos involucrados y los estados de oxidación del nitrógeno.
- 2) a) ¿Qué entiende por fijación del nitrógeno? Formule la ecuación correspondiente.
b) ¿Qué tipos de fijación conoce y cuál es su contribución relativa?
c) ¿A que se llama fijación biológica del N_2 ?
e) ¿Qué tipo de fijación biológica conoce?
- 3) En la fijación simbiótica del N_2 :
 - a) Explique el proceso de infección radicular por parte de las bacterias fijadoras y mencione qué cambios se producen en éstas y en el hospedante.
 - b) ¿Qué tipo de molécula es la leghemoglobina? ¿Cómo y dónde se sintetiza? ¿Cuál es su función en la fijación del N_2 ?
- 4) a) ¿Cómo está constituido el complejo nitrogenasa?
b) ¿Qué otros compuestos pueden reducir la nitrogenasa?
c) ¿Cuál es el destino del NH_3 en el bacterioide y en el hospedante? ¿Qué enzimas intervienen?
- 5) ¿Cuál es la actividad catalítica de la hidrogenasa y su importancia biológica?
- 6) a) ¿Qué es la amonificación?
b) ¿Qué compuestos químicos presentes en el suelo pueden originar amoníaco?

- 7) a) ¿Cuál es el concepto de nitrificación? Formule la ecuación correspondiente.
 b) ¿Qué tipo de proceso es teniendo en cuenta la variación de energía libre?
 c) Mencione un género de bacterias que intervienen en cada etapa de este proceso.
- 8) ¿Cuál es la forma química nitrogenada del suelo que es absorbida en mayor cantidad por las plantas?
- 9) a) ¿Qué es la reducción asimiladora de los nitratos?
 b) ¿Cuáles son las dos etapas involucradas en dicho proceso? Formúlelos indicando enzimas, dadores de protones y electrones en células fotosintéticas y no fotosintéticas.
- 10) a) Formule las vías de asimilación de amonio en las plantas (GDH, GS, GOGAT).
 b) ¿Cuál de las vías es más ventajosa en lo que respecta a la afinidad de la enzima por el sustrato?
 c) Relacione este proceso con la eficiencia de la fotosíntesis.
- 11) Formule la ecuación de degradación de la urea. ¿Cual es la importancia de este proceso para las plantas?
- 12) ¿Qué es la denitrificación?

METABOLISMO DEL NITRÓGENO (PROBLEMAS INTEGRADORES)

- 1) Un productor implantó una pastura consociada en cuya composición la especie preponderante es la alfalfa. Previo a la siembra, el productor realizó la inoculación de las semillas con las bacterias apropiadas. Posteriormente comprobó que las plantas de alfalfa no alcanzaron el desarrollo esperado. Desenterrando algunas de ellas, verificó la presencia de muy baja cantidad de nódulos en las raíces. Decidió entonces consultar a un Ing. Agrónomo, quien propuso dos hipótesis: 1) deficiencia de fósforo en el suelo; 2) alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo. Indique:
 - a) ¿Qué fundamento bioquímico explica la falla en la nodulación y, por lo tanto, en la fijación de nitrógeno en condiciones de deficiencia de fósforo?
 - b) En condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo, ¿cuál supone es la entidad química del nitrógeno que ingresa preponderantemente a las plantas y de qué manera este compuesto influye negativamente en la fijación del nitrógeno? Utilice fundamentos bioquímicos.
 - c) Con respecto al compuesto mencionado en el punto (b), ¿qué procesos deben ocurrir para que el nitrógeno pase a formar parte de biomoléculas? Indique las enzimas que catalizan dichos procesos.
 - d) En condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo, ¿qué sucederá con la síntesis de leghemoglobina? Fundamente la respuesta.
- 2) En un ensayo en macetas, se sembraron semillas de soja inoculadas con una cepa de *Rhizobium japonicum*. Después de la aparición de los primeros nódulos se adicionó una solución de KNO_3 10 mM (día cero). Las plantas control fueron tratadas en forma idéntica, pero reemplazando KNO_3 por KCl. Cinco días después de adicionadas las soluciones citadas, se lavó el KNO_3 de algunas de las plantas tratadas, cultivándoselas en un medio que reemplazaba el KNO_3 con KCl. Todos los días se incubaron las raíces intactas lavadas procedentes de plantas de los diferentes tratamientos con 5% de acetileno (C_2H_2) en aire durante 1 hora a temperatura ambiente, procediéndose posteriormente a la determinación de la actividad nitrogenasa a través de la medición de la concentración de etileno (C_2H_4) por cromatografía gaseosa. Los resultados se observan en el siguiente gráfico (Figura 1):

FIGURA 1

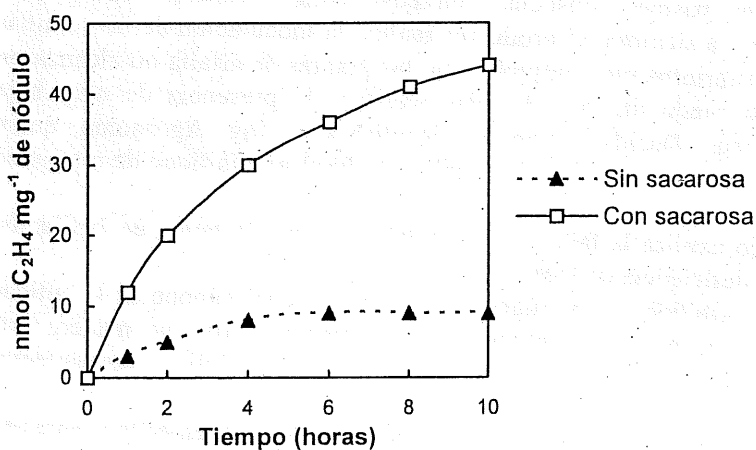


a) ¿Cuál es el fundamento de la medición de la actividad nitrogenasa utilizando acetileno como sustrato? (Recuerde la reacción completa que cataliza la nitrogenasa)

b) Comente los mecanismos involucrados que motivaron las variaciones de la actividad nitrogenasa en plantas con presencia de 10 mM de KNO₃ y en plantas lavadas a los 5 días.

En el mismo ensayo se separaron nódulos de las plantas tratadas con la solución de KNO₃ 10 mM, midiéndose la actividad nitrogenasa con y sin adición de una fuente carbonada (sacarosa). Los resultados se presentan en la figura 2.

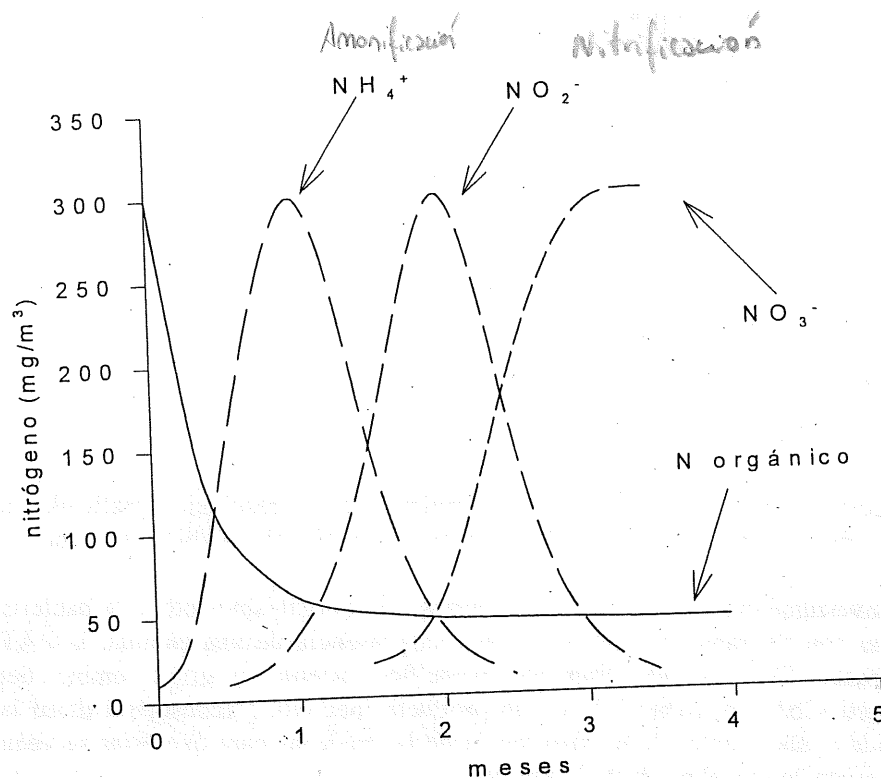
FIGURA 2



c) Sin considerar las limitaciones que genera el trabajo con nódulos separados de la planta, ¿qué sugiere el gráfico anterior? Justifique.

d) Asumiendo fotosíntesis activa, describa las reacciones que conducen a la síntesis de sacarosa en una planta en crecimiento.

3) Se realizó una experiencia en donde residuos orgánicos fueron colocados en un cámara de cultivo enriquecida con microorganismos del suelo y en condiciones aeróbicas. El cultivo se prolongó durante varios meses en los cuales fue determinada la cantidad de nitrógeno orgánico, amonio, nitritos y nitratos en el medio de incubación. Los resultados obtenidos permitieron construir el siguiente gráfico.

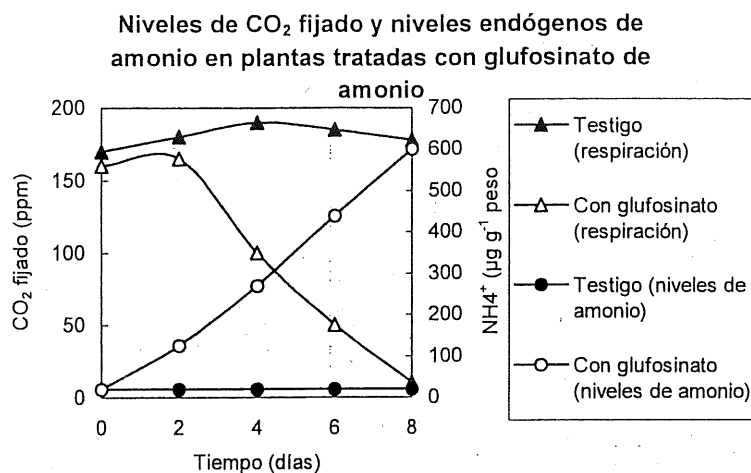


Realice una discusión de los resultados considerando cada una de las curvas obtenidas, indicando:

- Procesos bioquímicos involucrados y organismos intervinientes.
- ¿Es posible en algún período determinado obtener una mezcla útil de NH_4^+ y NO_3^- ? ¿Podría algún organismo interviniente verse inhibido por altas concentraciones de NH_4^+ ? En caso de ser así indique cuál. *No, porque las condiciones son aerobias. Bacterias nitrificantes.*
- ¿Cómo continuarían las curvas si a los 4 meses se extrajera totalmente el oxígeno de la cámara? ¿Aumentaría el contenido de alguna forma nitrogenada no representada en el gráfico original? *Aparecería N_2 por fijación.*

4) En una de las situaciones problemáticas de la Guía de Teórico-Prácticos concerniente al metabolismo del nitrógeno, se hace referencia al **glufosinato de amonio**, un herbicida que resulta un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS).

- ¿Qué reacción cataliza dicha enzima?
- La vía GOGAT-GS constituye una de las vías para la síntesis de glutamato. ¿Qué enzima actúa en vegetales como vía alternativa para dicha síntesis, y en qué condiciones estima usted incrementa esta enzima su actividad?
- Un ingeniero agrónomo efectuó una aplicación de glufosinato de amonio sobre la maleza Sorgo de Alepo, registrando los valores de fotosíntesis (medida como CO_2 fijado en ppm) y niveles endógenos de amonio (en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco) expresados en el gráfico. Explique los resultados obtenidos en función del mecanismo de acción del glufosinato.



d) Se investigó la acción inhibitoria del herbicida, obteniéndose los resultados graficados a continuación. Comente dichos resultados, indicando además de qué tipo de inhibidor se trata.

f) En 1987, algunos investigadores descubrieron que ciertos microorganismos como la bacteria del suelo *Streptomyces* son tolerantes al glufosinato por la presencia de una enzima, la PAT (fosfinoacetil transferasa). Esta enzima altamente específica, acetila el grupo amino del glufosinato usando acetil-CoA, convirtiendolo en un producto inactivo. ¿Aconsejaría usted la aplicación del herbicida al suelo antes de la emergencia de las malezas para que éstas se vean afectadas al entrar en contacto con el producto? ¿Por qué?

g) El herbicida glufosinato no es selectivo (es decir, afecta tanto a malezas como a cultivos). Sin embargo, algunos investigadores descubrieron el gen que codifica para la enzima PAT en la bacteria *Streptomyces* (según se menciona en la pregunta anterior). Discuta las posibilidades que este descubrimiento ofreció para lograr una forma efectiva de selectividad (es decir, que no afecte a los cultivos y sí a las malezas).

5) En el ciclo del N las bacterias del género *Nitrosomonas* son responsables de la primer etapa de la nitrificación y son autótrofas. Cuando dichas bacterias se cultivan en presencia de NH₃ y en condiciones de aerobiosis se verifica un aumento de pH en el interior de la bacteria y una disminución en el exterior. Indique:

a) Escriba la reacción en que intervienen las bacterias del género *Nitrosomonas*.

b) ¿Cuáles son, a su entender, los mecanismos que ponen en juego estas bacterias y qué beneficio obtiene de ellos?

c) ¿Se verificarían, a su entender, los mismos resultados si estas bacterias se incubaran en presencia de NH₃ pero en condiciones anaeróbicas? Fundamente.

6) Se sabe que el nivel de mensajeros (ARNm) de GS2 y Fd-GOGAT (Enzimas cloroplásticas) es muy bajo en las raíces de plantas de trigo (C3), mientras que en hojas es alto. Para estudiar la influencia del aporte de N del suelo en la expresión génica de dichos mensajeros en las raíces y estructuras verdes de la planta, se agregó KNO₃ (10 mM) a un cultivo hidropónico de plántulas de trigo en cámara de crecimiento. A las dos horas del agregado se realizó la extracción y medición de la inducción relativa de los mRNA para cada uno de los genes en cuestión y el de nitrato reductasa (NR).

El gráfico 1 muestra el resultado obtenido.

Hidropónico: No está en suelo. Puede ser aireado.

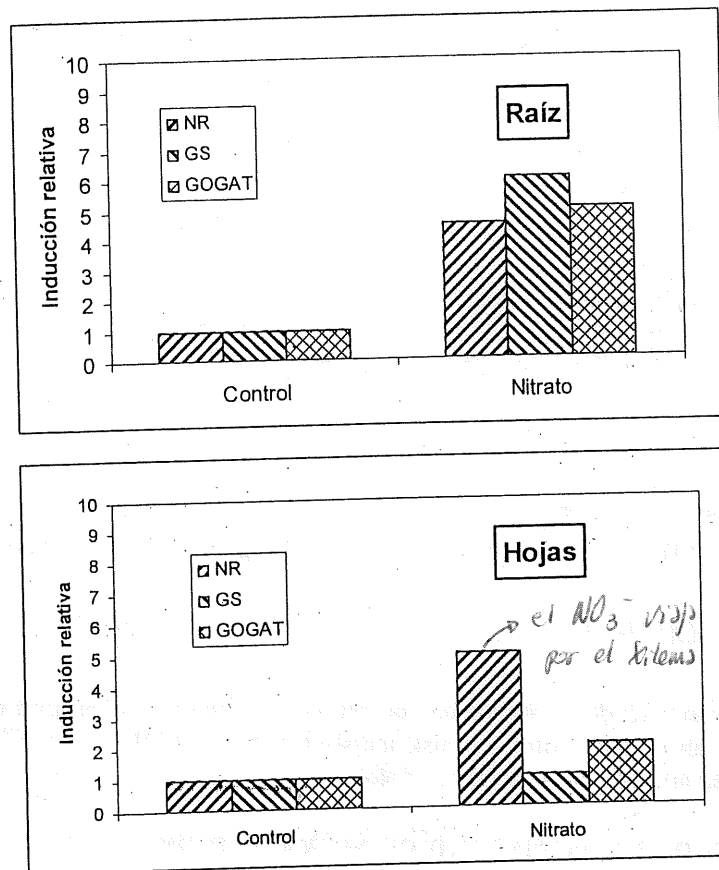


Figura 1: Inducción relativa de los mRNA para los genes de GS, NR y GOGAT en raíz y hojas.

- Por qué cree que los niveles de ARNm de GS2 y Fd-GOGAT son alta en hojas. (Relaciónelo con la actividad oxigenasa de RUBISCO en plantas C3).
- Plantee la ecuación catalizada por las tres enzimas, señalando cofactores y productos de reacción
- 1) Explique la necesidad de luz en el diseño de la experiencia. Cómo cree que fue realizado el tratamiento control?
- ¿Qué efecto se observa sobre el nivel de mRNA de GS, GOGAT y NR con el NO_3^- en cada uno de los tejidos vegetales?
- Sugiera un mecanismo de acción de NO_3^- . Explique qué entiende por inductor.
- De dónde provienen los cofactores usados por estas enzimas en cada uno de los órganos.
- ¿Cuál podría ser la causa del diferente nivel de inducción de mensajeros para estas enzimas en hojas y raíces?
- Si quisiera disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados en este tipo de cultivos, cree que sería posible el uso de "fertilizantes ecológicos"? Qué tipos de microorganismos se asocian con estas plantas? La presencia de altos niveles de nitratos en la solución del suelo podría afectar la FBN? Justifique.

Objetivo:

Cuantificar la Actividad de la Nitrato Reductasa

METABOLISMO DEL NITRÓGENO (TRABAJO PRÁCTICO EXPERIMENTAL)

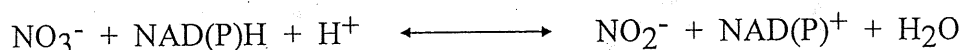
I- ACTIVIDAD DE NITRATO REDUCTASA

Introducción

En condiciones normales de cultivo, los nitratos (NO_3^-) del suelo son los componentes nitrogenados preferentemente absorbidos por el sistema radicular. Los nitratos absorbidos del suelo pueden seguir tres destinos:

- a) ser reducidos en las células de las raíces;
- b) ser almacenados en vacuolas de las células de las raíces y de las hojas;
- c) ser transportados a órganos fotosintetizadores para ser allí reducidos.

La primera enzima involucrada en la reducción de los nitratos dentro de la planta es la nitrato reductasa (EC: 1.6.6.1). Esta enzima, que se encuentra también presente en otras células eucarióticas (de hongos y algas verdes) cataliza la reducción del nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) utilizando NADH o NADPH como dadores de electrones, según la siguiente reacción:



En cereales se han identificado 2 isoenzimas de nitrato reductasa: una dependiente de NADH (predominantemente en hojas) y otra que usa indistintamente NADH o NADPH (presente en órganos no fotosintetizadores como raíz y escutelo).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE NITRATO REDUCTASA "IN VIVO"

Fundamento

La incubación de discos de hoja en presencia de sustrato (NO_3K) y en oscuridad (de forma de frenar la actividad de la nitrito reductasa) permite valorar colorimétricamente la cantidad de NO_2^- (producto) producidos por la actividad de la nitrato reductasa.

Técnica

Se cortan con sacabocados 5 discos de hoja de 0,5 cm de diámetro evitando tomar la nervadura principal y se suspenden en un tubo de ensayo 5 ml de solución reguladora de fosfatos 1M, pH=7,5 que contiene isopropanol 4% y nitrato de potasio (NO_3K) 0,02N.

Se incuba en oscuridad, a 30°C durante 1 hora y 30 minutos. Transcurrido ese lapso, se retiran los discos con una pinza y en otro tubo de ensayo se coloca 1 ml del incubado, 1 ml de solución de sulfanilamida 1% (P/V) en HCl 3N, y 1 ml de solución de naftilendiamina 0,01% (P/V).

Se mezcla y se lee la absorbancia a 540 nm contra un blanco que se realiza reemplazando el ml de incubado por 1 ml de agua destilada. La absorbancia obtenida con el ensayo se convierte en microgramos de NO_2^- producidos mediante una curva previamente realizada con cantidades crecientes de droga estándar.

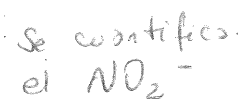
La cantidad de nitrato reductasa se expresa en μg de NO_2^- producidos en 1 hora por gramo de peso fresco (el dato de peso fresco de los discos de hoja utilizados será proporcionado por el docente).

Se corta la fotosíntesis para que no haya Fd red y no actúe la Nitrito Red.

Se corta la Nitrito Red. quitando al material vegetal.

El Blanco deberá ser Buffer para que sea más preciso.

La Nitrito Red. necesita luz para poder funcionar

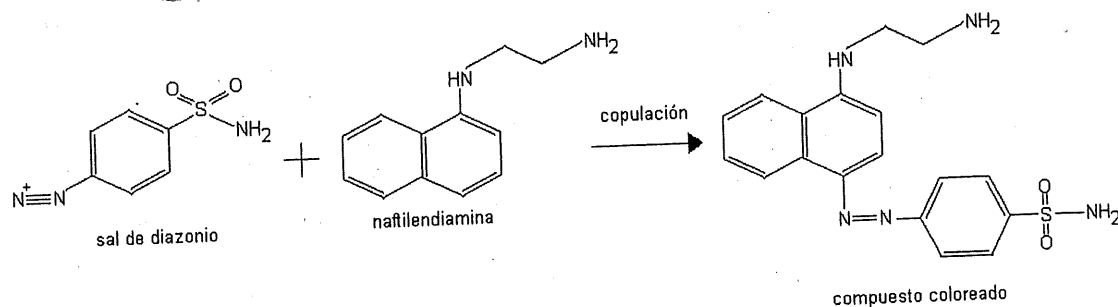
$$A_{\text{Lito}}: 0,173$$


X: cont. de Nitrito

$$AE = \frac{\mu\text{g NO}_2^-}{\text{m (g)} \cdot \text{t (minutos)}} \rightarrow 90 \text{ minutos}$$

↳ material vegetal

Incoloro



Rosa

1 ml de Agua Destilado

5 trozos $1 \text{ cm largo} = 0,406 \text{ g}$

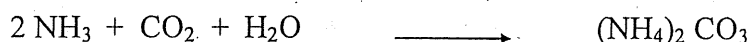
II- ACTIVIDAD DE UREASA EN SUELO

Introducción:

La urea (metabolito de excreción urinaria de animales superiores, fertilizante inorgánico industrial) se descompone enzimáticamente en el suelo en CO_2 y NH_3 por acción de la ureasa (E.C. 3.5.1.5.), la cual es una hidrolasa que rompe uniones C-N no peptídicas.



A su vez el dióxido de carbono y el amonio pueden formar carbonato de amonio:



La ureasa puede hallarse en el suelo en forma insoluble pero enzimáticamente activa como consecuencia de su adsorción a las arcillas del perfil edáfico y a otros soportes inorgánicos presentes. Las ureasas inmovilizadas exhiben una cinética diferente de las enzimas libres (diferente velocidad máxima y K_m).

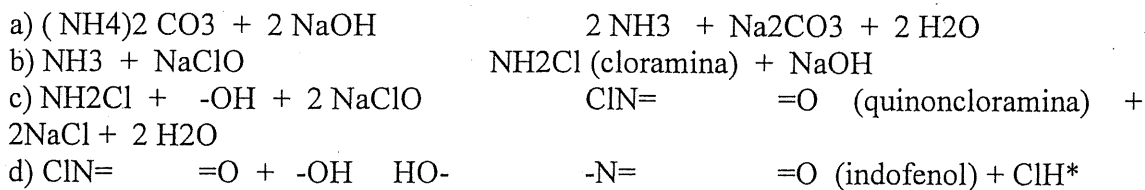
Las ureasas en el suelo actúan exocelularmente como enzimas estabilizadas protegidas. Se estima que las ureasas libres en el suelo son de origen microbiano, aunque las plantas son fuentes ricas de las mismas.

La urea, sustrato de la enzima, llega al suelo a través de las excreciones urinarias de animales superiores como resultado de la eliminación del nitrógeno no utilizado o puede ser agregada en forma de fertilizante sólido mediante su dispersión sobre la superficie del cultivo.

La liberación de amoníaco y la elevación del pH puede acarrear problemas en la germinación de semillas, provocar la polución del aire por volatilización o contaminación del agua por lixiviación a la napa freática.

Técnica:

Para determinar la cantidad de amonio liberada por la acción enzimática en una dada muestra de suelo, se utiliza una técnica colorimétrica. La misma tiene como principio la reacción del amoníaco con hipoclorito de sodio en un medio fenol-alcalino.



* el medio alcalino mantiene al fenol desprotonado, desplazando además, la última reacción hacia la derecha formando NaCl .

Para ello se requiere de la confección previa de una curva de calibración, a partir de una solución patrón de concentraciones conocidas de amonio. Para realizar la curva se sigue el siguiente procedimiento:

Tubo N° duplicados	1 1'	2 2'	3 3'	4 4'	5 5'	6 6'	7 7'
Solución patrón (ml)	0	0.5	1	2	3	4	5
μg de NH_4^+	0	5	10	20	30	40	50
Solución A (ml)*	2	2	2	2	2	2	2
Solución B (ml)**	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Agua c.s.p. 12 ml	8.5	8.0	7.5	6.5	5.5	4.5	3.5
<i>Agitar, dejar reposar 10 minutos y leer en espectrofotómetro a 630nm</i>							
Absorbancia							
Absorbancia duplic.							
Absorbancia prom.							

* Solución A: solución de fenol alcalino

** Solución B: solución de hipoclorito de Na, 0,9% de cloro activo.

A partir de los datos de absorbancia y las cantidades conocidas de amonio, graficar los mismos en la siguiente gráfica.

Para determinar la actividad de ureasas contenidas en distintos suelos deberá seguirse la siguiente metodología:

Erlenmeyer de 100ml	Muestra	Blanco
Suelo (g)*	5	5
Tolueno (ml)	1.5	1.5
<i>Agitar y dejar reposar 15 minutos</i>		
Solución de UREA 10% (ml)	5	---
Agua destilada (ml)	---	5
Buffer citrato pH 6,7 (ml)	10	10
<i>Mezclar suavemente por agitación, tapar e incubar 1 hora y 30 minutos a 37°C</i>		
Agua destilada (ml)	5	5
<i>Mezclar suavemente por inversión y filtrar inmediatamente</i>		
En tubo de ensayo, alícuota (ml)	1	1
Solución A (A1 + A2)* (ml)	2	2
Solución B (ml)	1.5	1.5
Agua c.s.p. 12 ml	7.5	7.5
<i>Mezclar suavemente por inversión, dejar en reposo 10 minutos y leer en espectrofotómetro a 630 nm</i>		
Absorbancia		
Actividad enzimática μg NH_4^+ /g suelo.h		

* La muestra de suelo a utilizar fue tomada con pala plástica, fue secada en estufa hasta peso constante y fue tamizada.

TEMA 8 : BIOQUÍMICA DE LA GERMINACIÓN

ESQUEMAS

CONTENIDOS

- Germinación de granos y semillas
- Imbibición
- Respiración
- Fitorreguladores
- Movilización de reservas
- Glucogénesis
- Síntesis de sacarosa
- Vía de las Pentosas fosfato
- Ciclo del Glioxilato
- Gluconeogénesis

Fotosintetizantes: proveen esqueletos carbonados.

La semilla debe tener reserva energética y de N_2 para hacer enzimas y a.a.

La germinación termina con la emergencia de la radícula y pasa a la fase de crecimiento.

En germinación hay 2 fases:

- Fase de Hidratación: se absorbe H_2O y aumenta el peso. Esto activa la vía de Respiración.
- Fase de germinación: que genera ATP y restan los nucleótidos necesarios. Esto es para generar enzimas hidrolíticas, como la amilasa. (segunda fase).

Si el ambiente es anaerobio puede haber fermentación.

Dormición primaria (factores internos de la semilla):

Hace que la semilla no germine en la planta.

- ⇒ Presencia de ABA (hormona) → Impide que el embrión crezca
- ⇒ Impuesta por los tegumentos (acción mecánica, presencia de inhibidores, impermeabilidad al H_2O o al O_2) No dejan entrar el agua o salir los gases.

Dormición secundaria

Se induce por ausencia de señales medioambientales necesarias para la germinación (factores externos):

- ⇒ Disponibilidad limitada de agua
- ⇒ Temperatura (bajas, altas y alternancia de T°)
- ⇒ Disponibilidad de oxígeno
- ⇒ Luz (ej. el chamico)
- ⇒ Nutrientes (NO_3)

Rutas Respiratorias: glucólisis, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs.

Hay plantas sin Dormición, pueden germinar en la planta.

Dormición: restricción de la capacidad de germinación.

Composición Química de algunas semillas

Especie	Porcentaje en peso seco		
	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos
Maíz (<i>Zea mays</i>)	70	11	5
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	75	12	2
Avena (<i>Avena sativa</i>)	66	13	8
Lino (<i>Linum usitatissimum</i>)	24	24	36
Arveja (<i>Pisum sativum</i>)	52	24	6
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	67	17	6
Ricino (<i>Ricinus communis</i>)	trazas	18	64
Soja (<i>Glycine max</i>)	38	41	21
Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	?	15	50
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	28	9	49
Maní (<i>Arachis hypogaea</i>)	12	31	48
Colza	19	21	48

→ Se almacenan en los cuerpos lipídicos

Reservas
Energéticas

Almidón y
Hemicelulosas

Reservas de
 N_2

Bewley y Black, 1994

Reservas
Energéticas

Triglicéridos
Predominan los Ácidos Grasos
Insaturados.

Fitina: almacén de P asociada a la Aleurona y globoides.

Dicotiledóneas: tienen sus reservas en forma de lípidos y proteínas. Los Mono en forma de Glúcidos.

La Aleurona es reserva de Proteínas. son degradadas por enzimas proteolíticas o Proteasas.

MONOCOTILEDÓNEA

Embrión

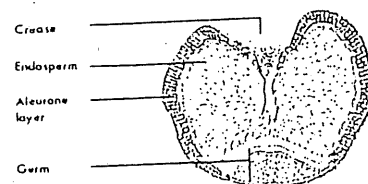
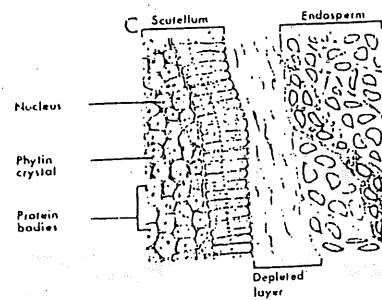
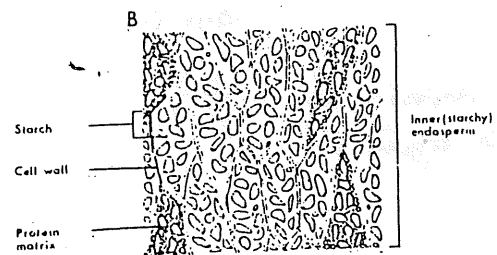
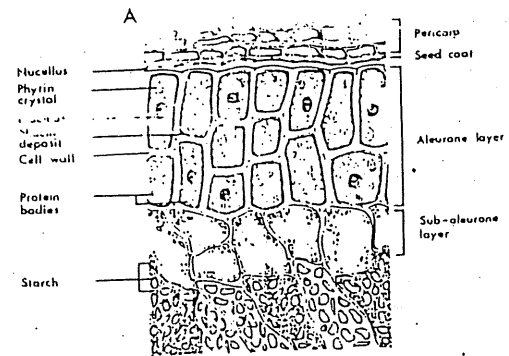
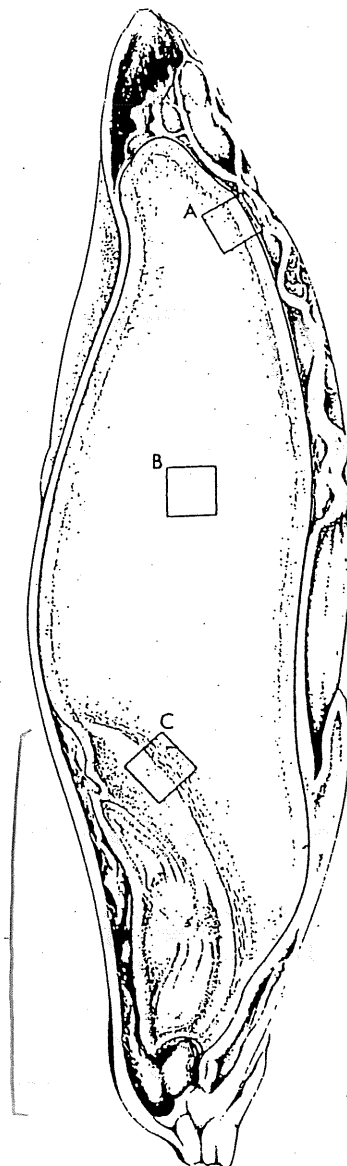
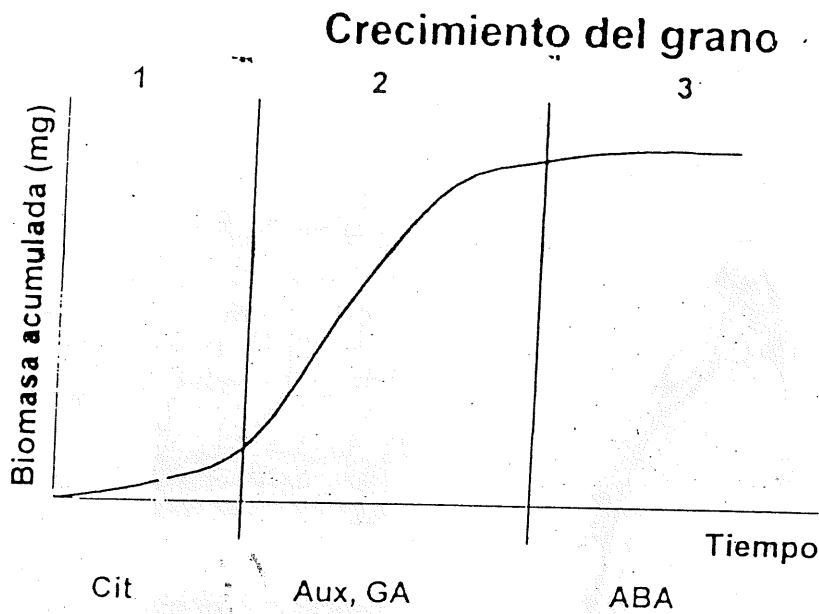


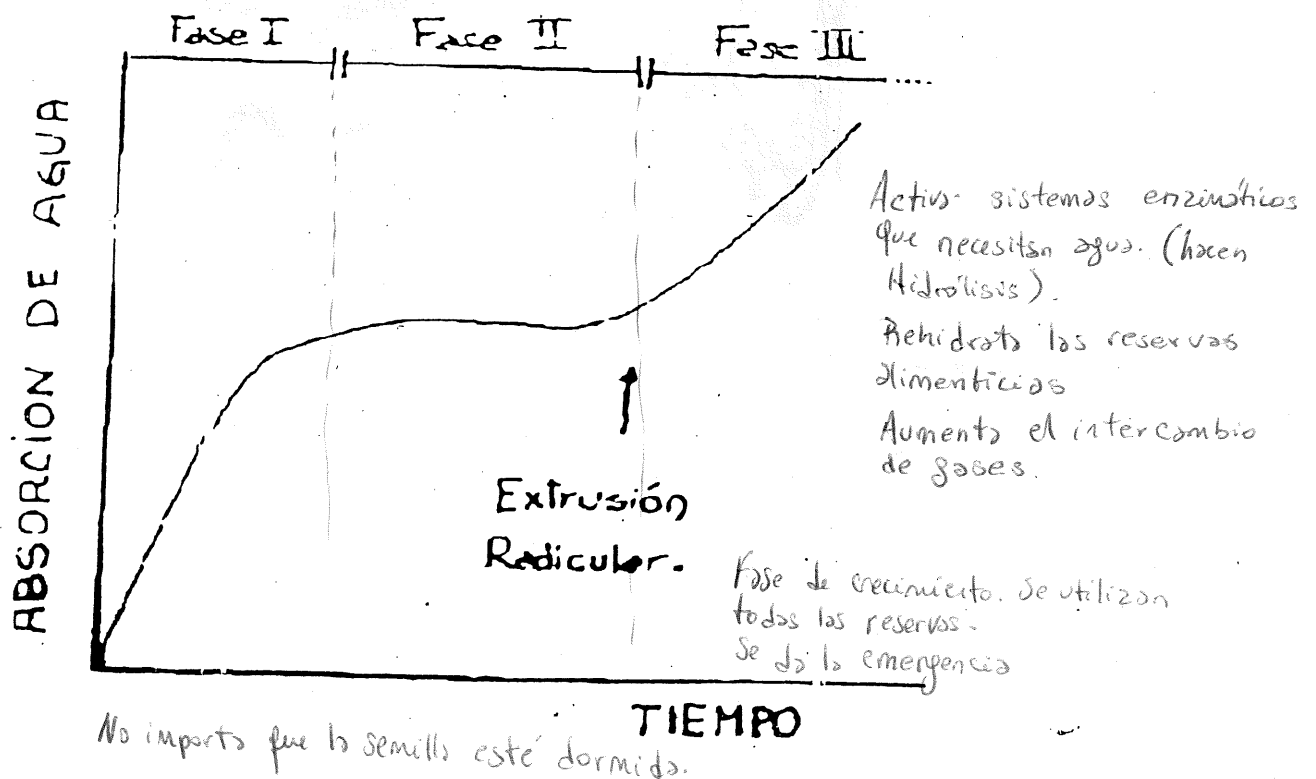
Diagram of the anatomy of a barley (*Hordeum vulgare* L.) kernel showing the tissue relationships in longitudinal (left) and cross section (lower right). Enlargements show cellular details in the bran (A), central endosperm (B) and at the embryo-endosperm interface (C). Diagram provided by R.G. Fulcher and S.I. Wong, Ottawa Research Station, Agriculture Canada.

Oleaginosas: el producto principal es el aceite y su principal reserva son lípidos (como en legumbres). Ubicados en cuerpos lipídicos degradados por lipasas. Los ácidos grasos se β -oxidan en el Glioxisoma.



Imbibición depende de la Disponibilidad de H_2O , composición química de la semilla, permeabilidad de los tegumentos.

Imbibición : fase luego de la germinación en la que se toma H_2O .



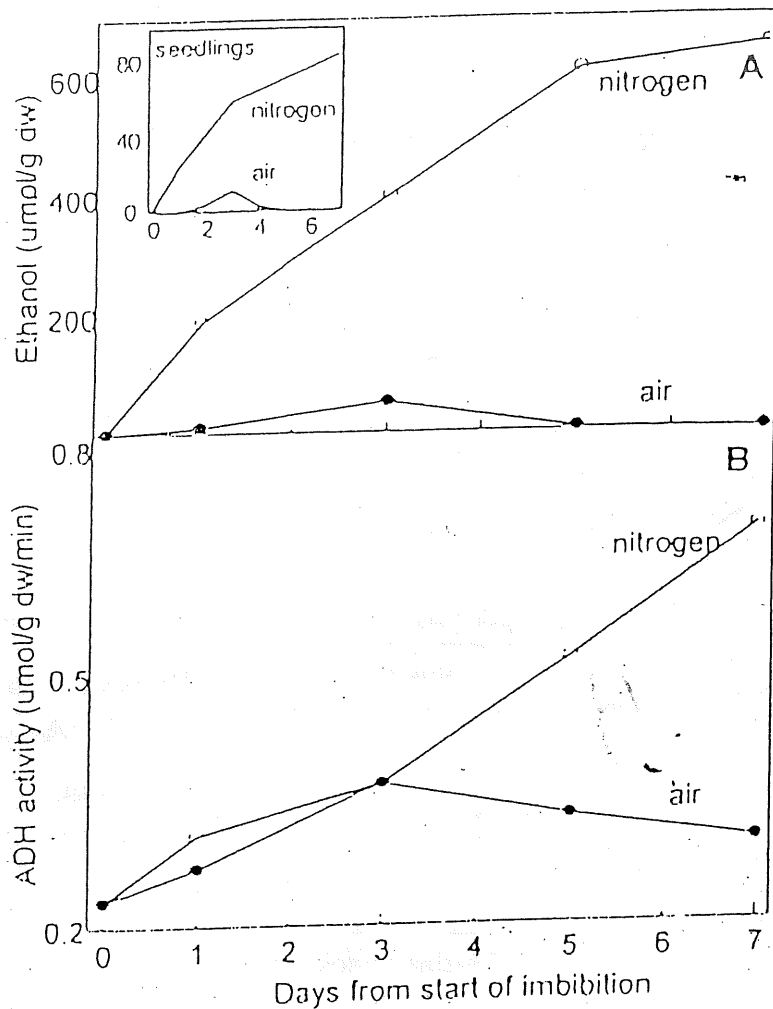
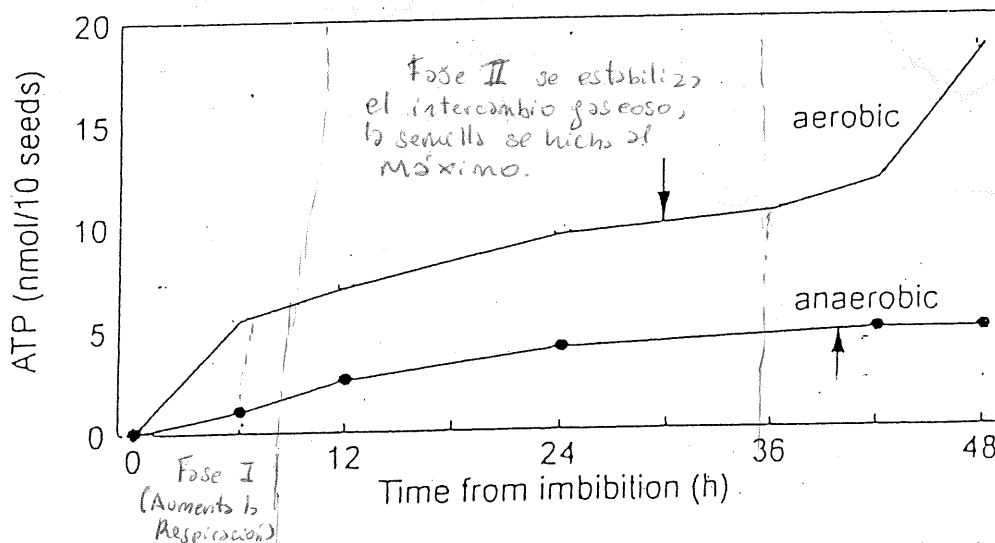


Figure 4.24. (A) Ethanol content of grains of *Echinochloa phyllopogon* imbibed in atmospheres of N₂ or air. The main graph is the sum of the ethanol content of the grains and the surrounding liquid, and the inset is the content of the seedlings alone. (B) Alcohol dehydrogenase activity. Germination was completed (i.e., coleoptile elongation commenced) by the third day from the start of imbibition. After Rumpho and Kennedy (1981).

- ↳ Respiración requiere consumo de energía.
- ↳ mayoría de los semillas no pueden germinar en altas concentraciones de CO₂.

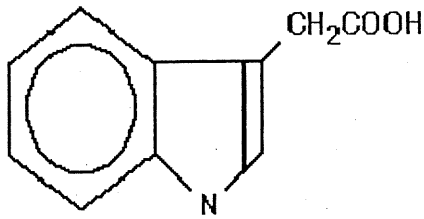


Fase III. Vuelve a aumentar la respiración. Se rompe la Testa.

Fase IV: disminuye la respiración por que se acabaron las reservas.

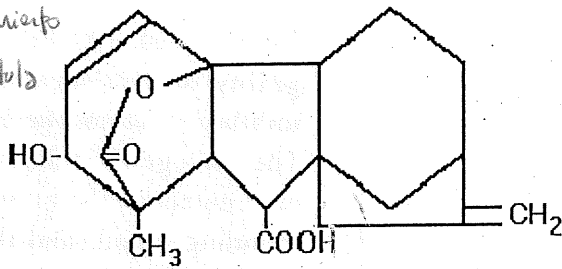
Figure 4.25. ATP content of rice during germination and growth under aerobic (○) and anaerobic (●) conditions. Arrows mark the time of coleoptile expansion (i.e., completion of germination) for each treatment. After Pradet and Prat (1976).

FITORREGULADORES



IAA (auxina)

Controlan la germinación y el crecimiento de la plántula

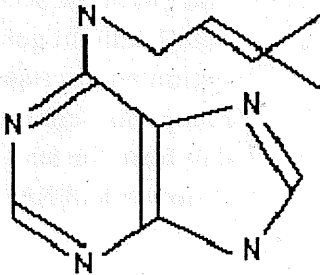


Gibberellina A₃

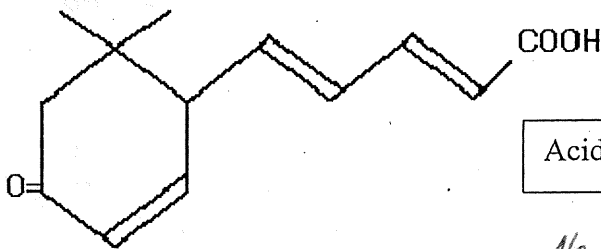
Promueve la síntesis de α-Amilasa

Se produce en el embrión

Así se degradan los glucidos
Inducción de la Transcripción

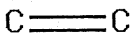


Zeatina (cytokinin)



Acido Abscísico

No germina en la planta



Etileno

En cereales el almidón es la principal fuente de reserva.

Cuando recibe H₂O sintetiza Gibberellina, que se dirige a la Aleurona y sintetiza α-Amilasa.

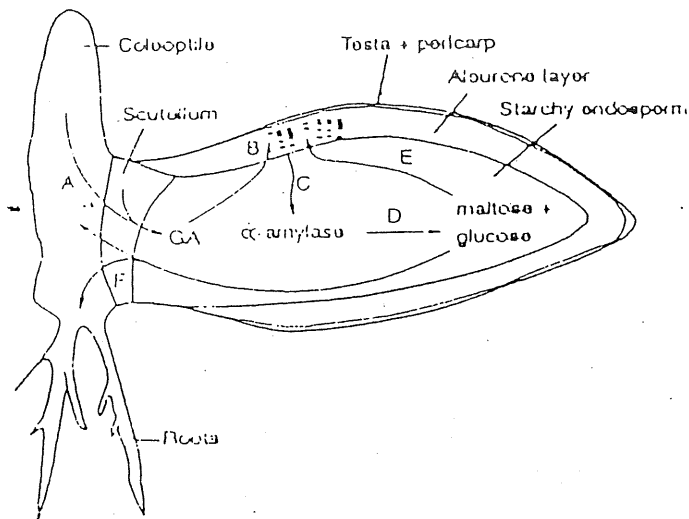


Figure 8.12. Summary diagram of the control mechanism for α -amylase production in intact barley grains. See text for details. After Jones and Armstrong (1971).

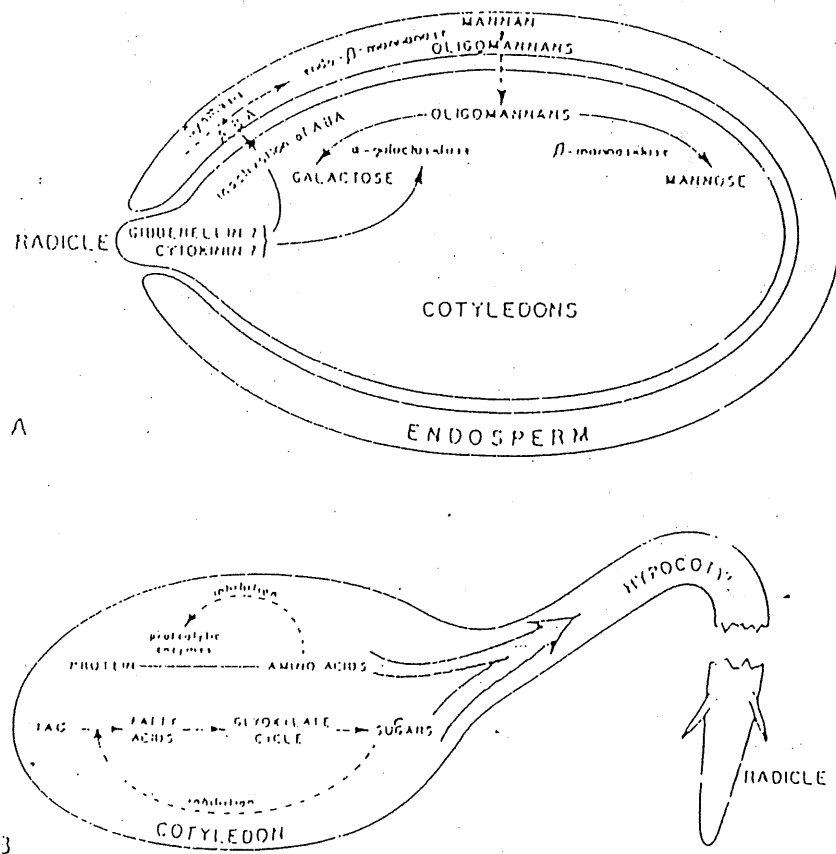
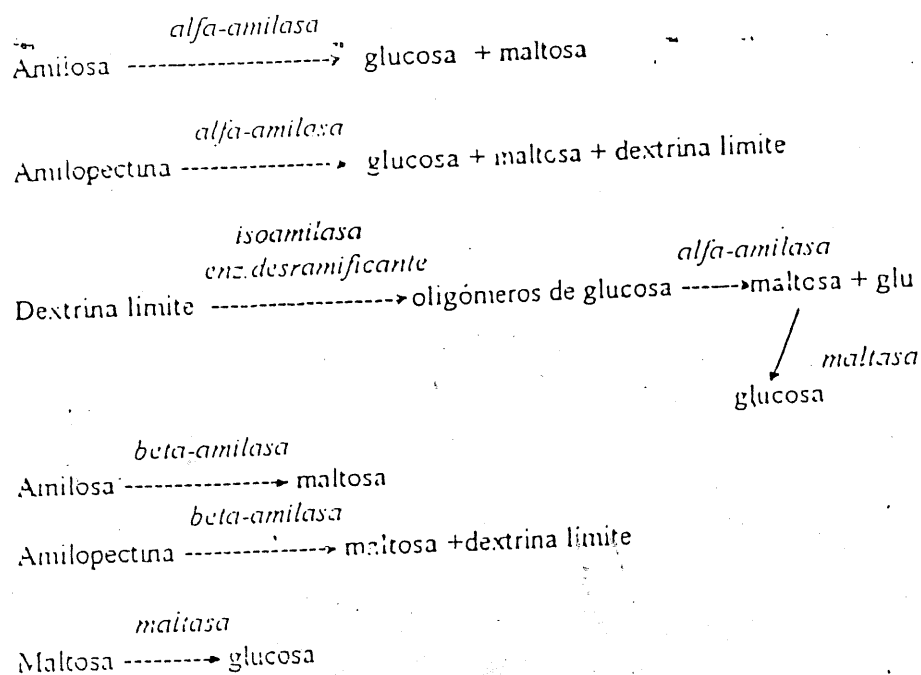


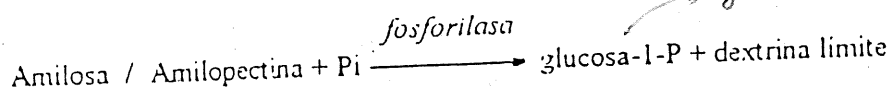
Figure 8.19. Hormonal and feedback regulation of mobilization. (A) Galactomannan reserves in the cell walls of the lettuce endosperm. After Bewley and Halmer (1980/81) and from data of Bewley *et al.* (1983). (B) reserves in the cotyledons of cucumber. From data of Davies and Chapman (1980) and Slack *et al.* (1971).

CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA

VIA HIDROLITICA



VIA FOSFOROLITICA : ahorro energía



Enzima	Cebada	Arroz	Arveja
alfa-amilasa	34,4	31,8	19
beta-amilasa	11,4	120	muy baja
fosforilasa	0	0,09	14,6

Las actividades se expresan como miligramos de almidón hidrolizados por hora, por semilla.

MOVILIZACION DEL ALMIDON DE RESERVA EN ENDOSPERMA DE CEREALES

1. Liberación de giberelinas desde el embrión via escutelo.
2. Liberación de alfa-amilasa y enzimas hidrolizantes de pared (después de síntesis *de novo*) desde el escutelo al endosperma: disolución de la pared celular e hidrólisis del almidón.
3. Liberación de alfa-amilasa, alfa-glucosidasa, enzimas desramificantes y enzimas hidrolizadoras de pared (después de la síntesis *de novo*) desde la capa de aleurona al endosperma.
4. Activación de beta-amilasa.
5. Absorción de glucosa por el escutelo. Síntesis de sacarosa para ser transportada al eje en crecimiento.

Hidrolisis de almidón

α -Amilasa

Uniones $\alpha(1\rightarrow4)$ desde el

extremo reductor.

Forman glucosas, maltosas

y dextrinas

Puede dar oligómero de glucosa.

Aumenta la Actividad Enzimática en la germinación

forma maltosa porque rompen de 2.

Atacan por el extremo no reductor.

Siempre genera maltosa.

Esta' desactivada e inactiva

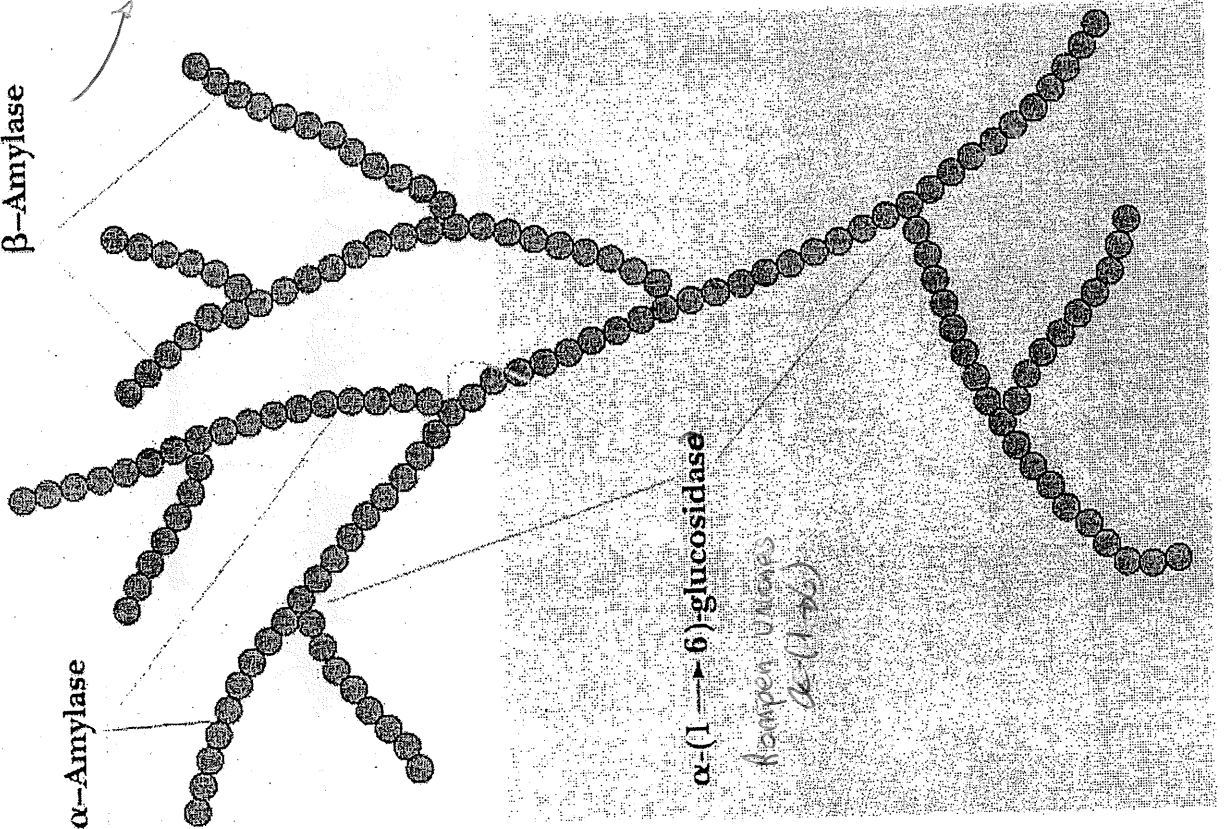
hasta que se da la germinación.

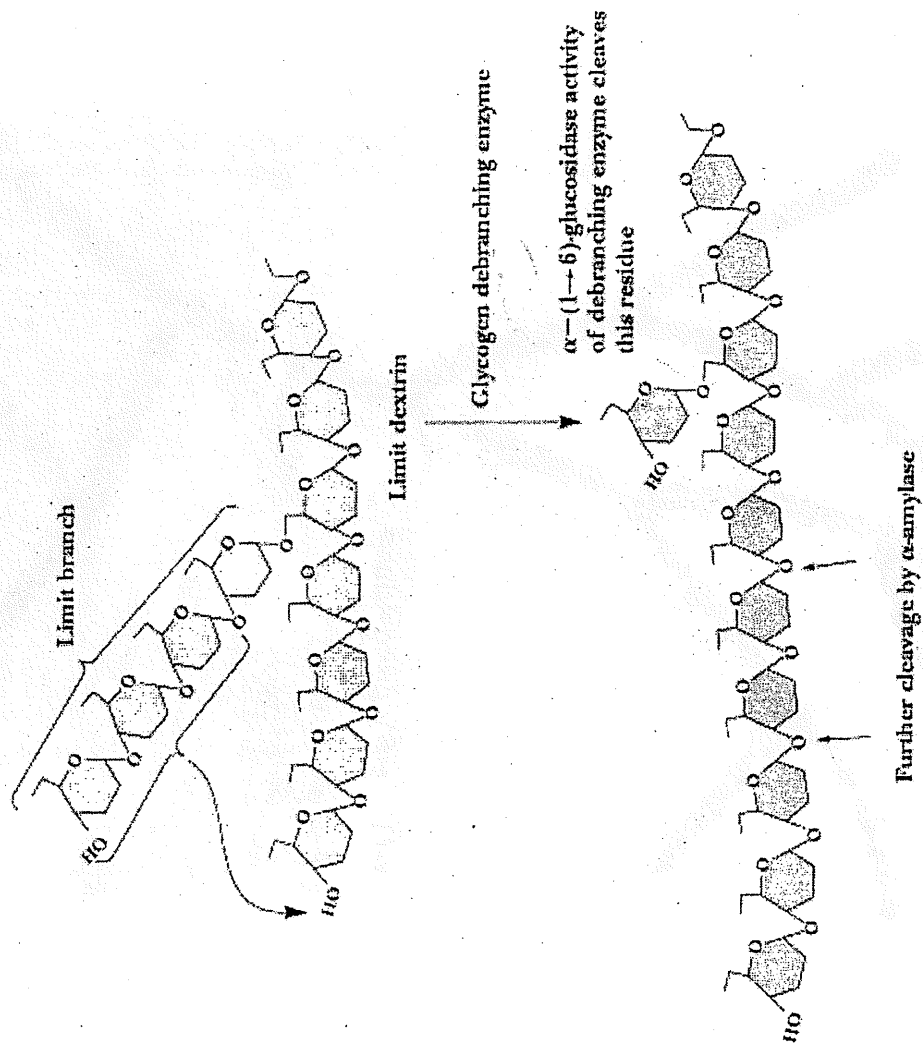
β -Amilase

α -Amilase

$\alpha(1 \rightarrow 6)$ -glucosidase

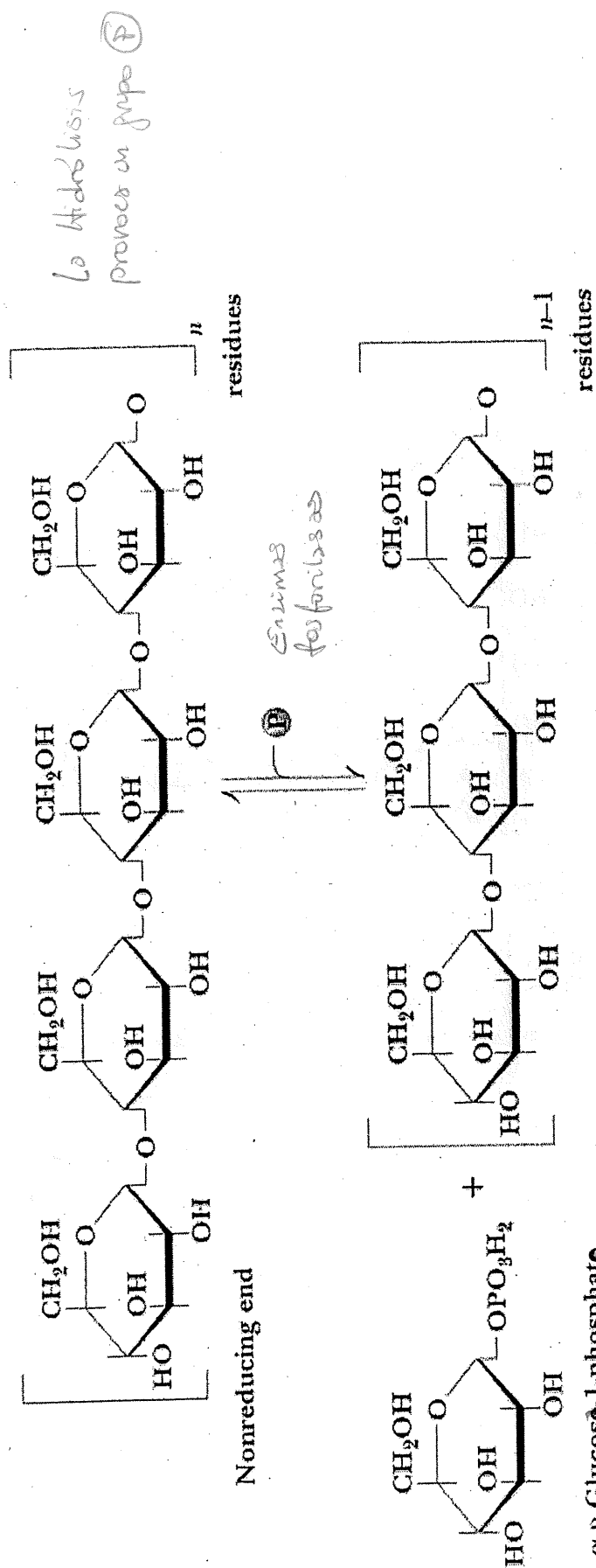
rompen enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$





Fosforólisis de amilosa

Esta vía se usa para ahorrar energía



Se ahorra ATP en la glucólisis porque
no se hace el primer paso de la glucólisis.
Se usa P_i y no ATP
También puede formar Sacarosa.

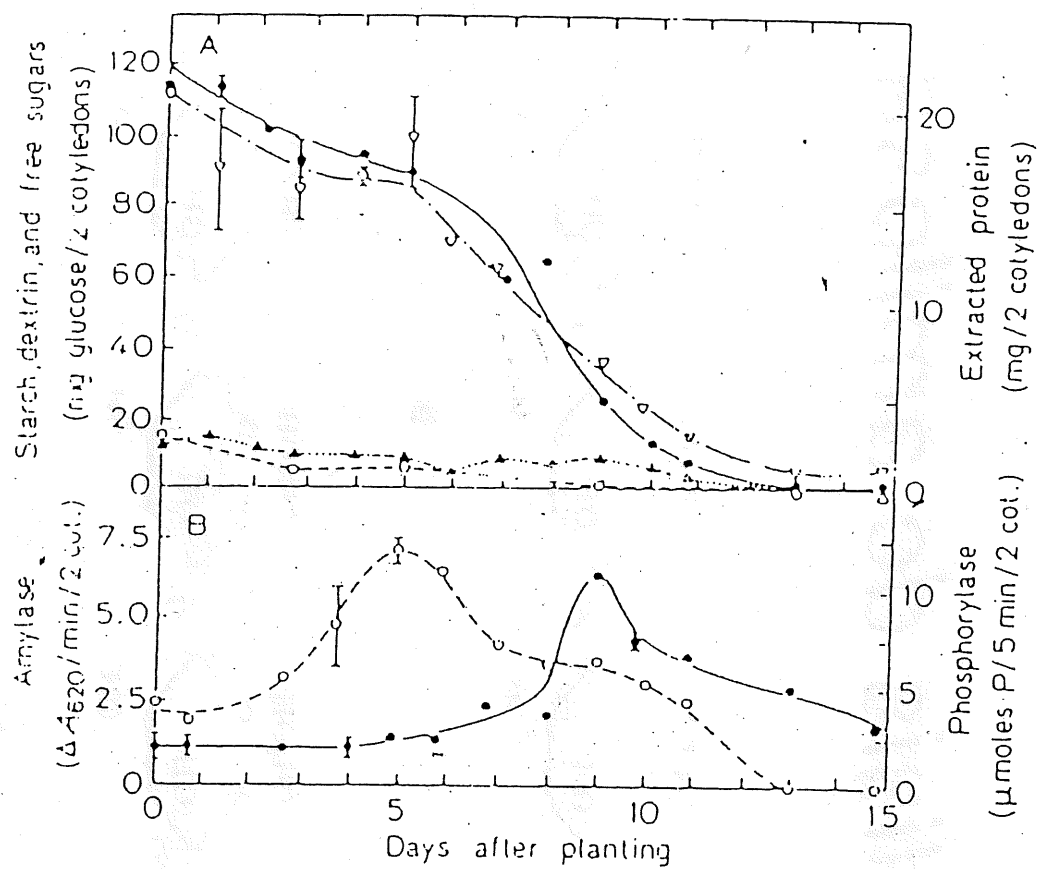
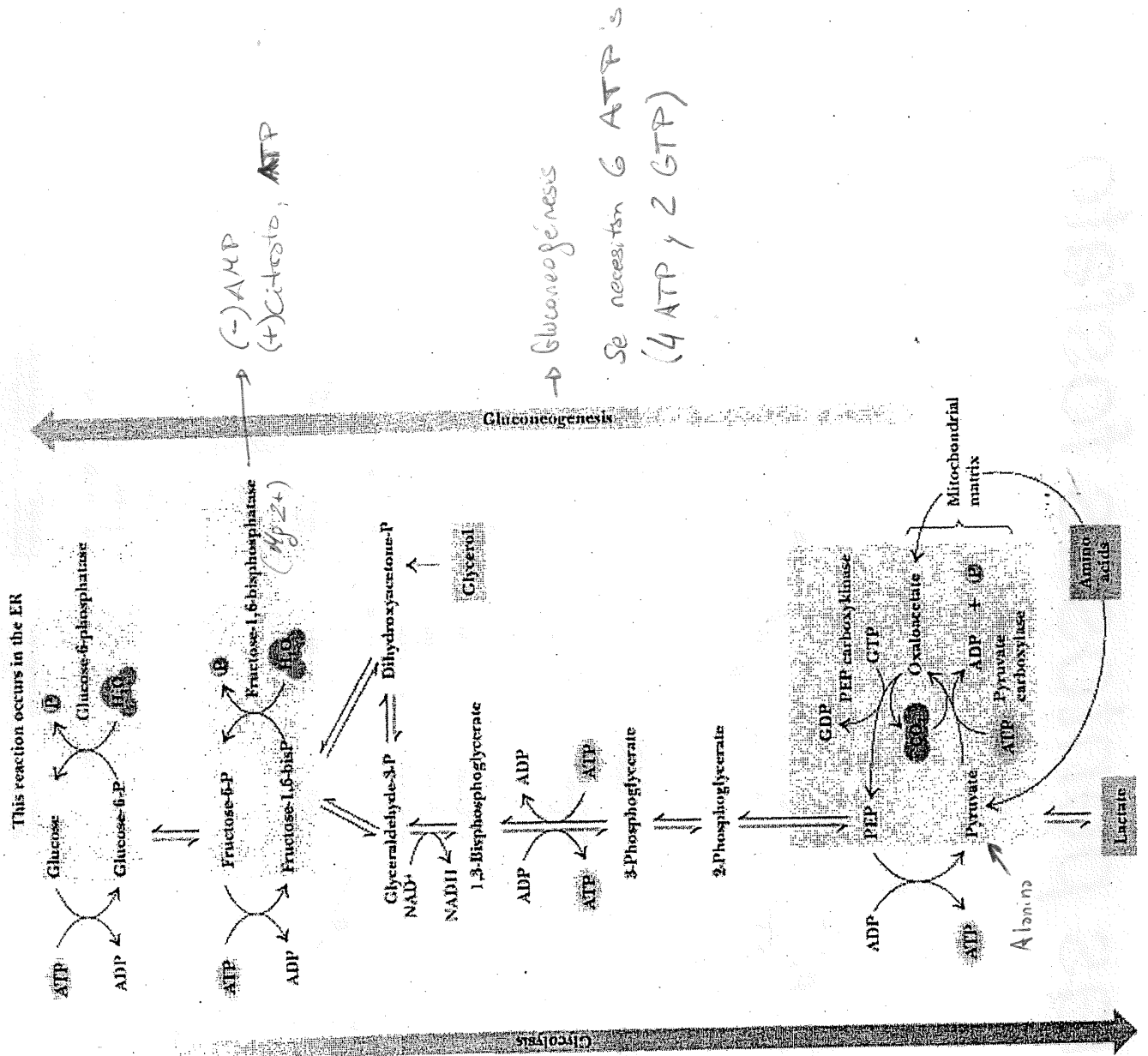


Figure 7.5. (A) Changes in the amount of starch and dextrin (●), dextrin (○), free sugars (▲), and extracted protein (▽) in the cotyledons of Alaska pea. (B) Changes in starch phosphorylase (○) and amylase (●) enzymes in Early Alaska pea. After Juliano and Varner (1969).

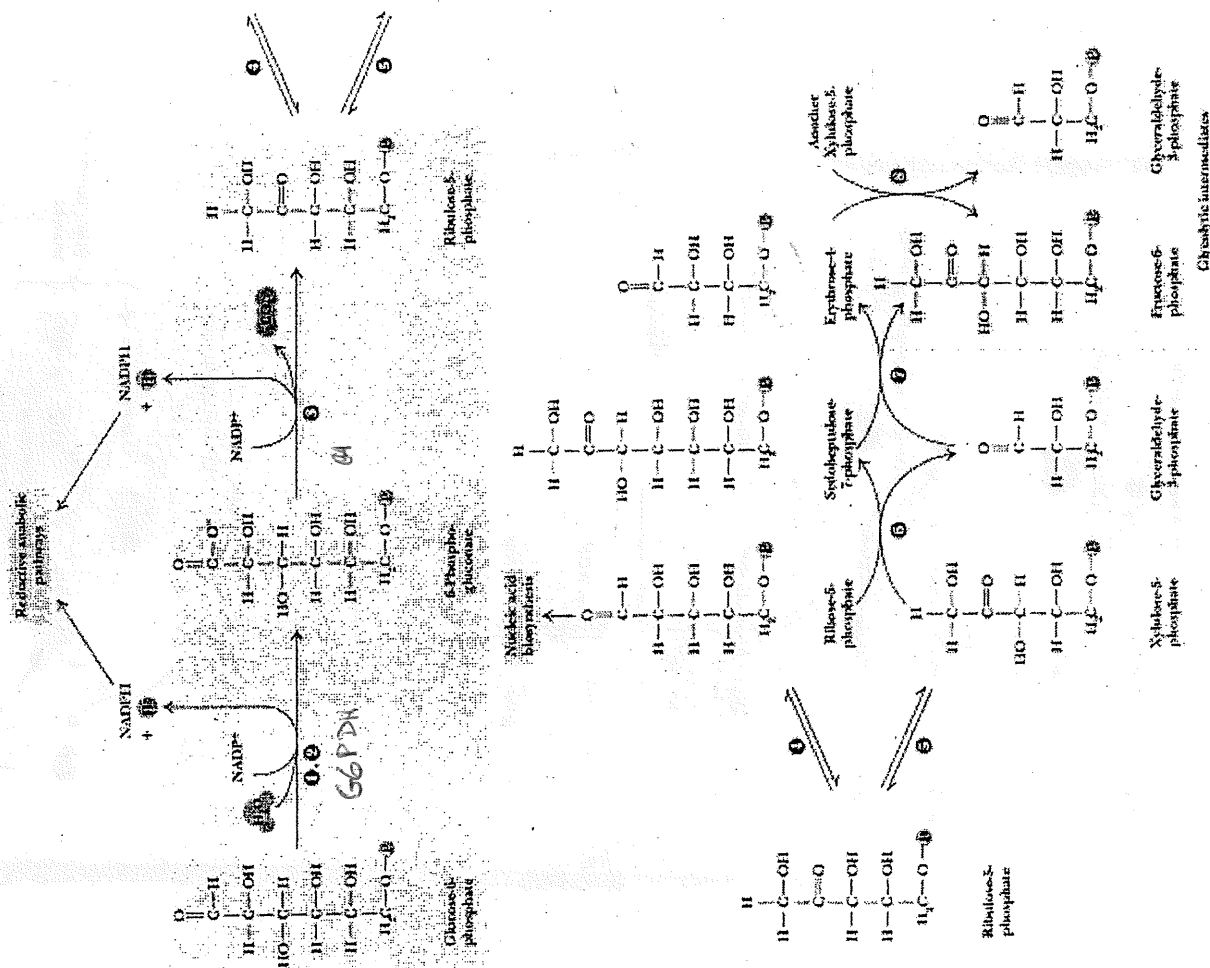


Vía de las pentosas fosfato

ENZIMAS

- 1) Glucosa-6-P deshidrogenasa
- 2) Gluconolactonasa
- 3) 6-Fosfogluconatodeshidrogenasa
- 4) Fosfopentosa isomerasa
- 5) Fosfopentosa isomerasa
- 6) Transcetolasa
- 7) Transaldolasa
- 8) Transcetolasa

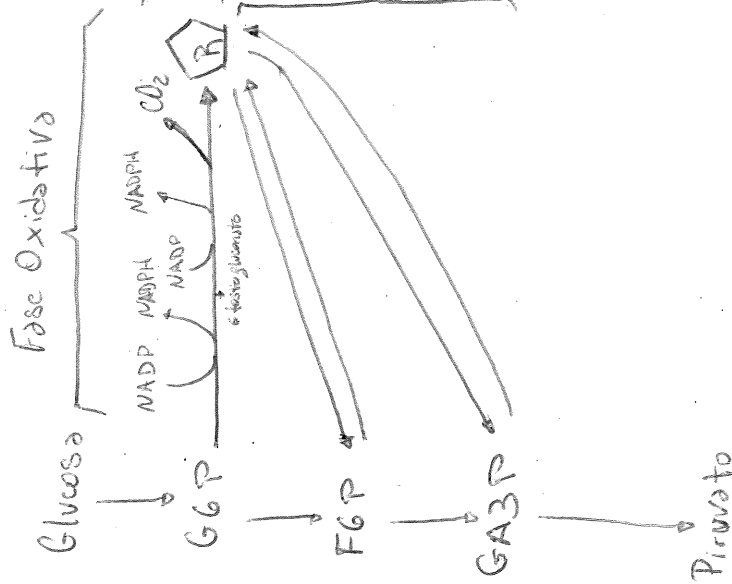
Provee NADPH para la
Síntesis de Ácidos Grasos
y Ribosa para Ácidos
Nucleicos.
Es importante en las
semillas para formar
NADPH, ya que en
hacen fotosíntesis.



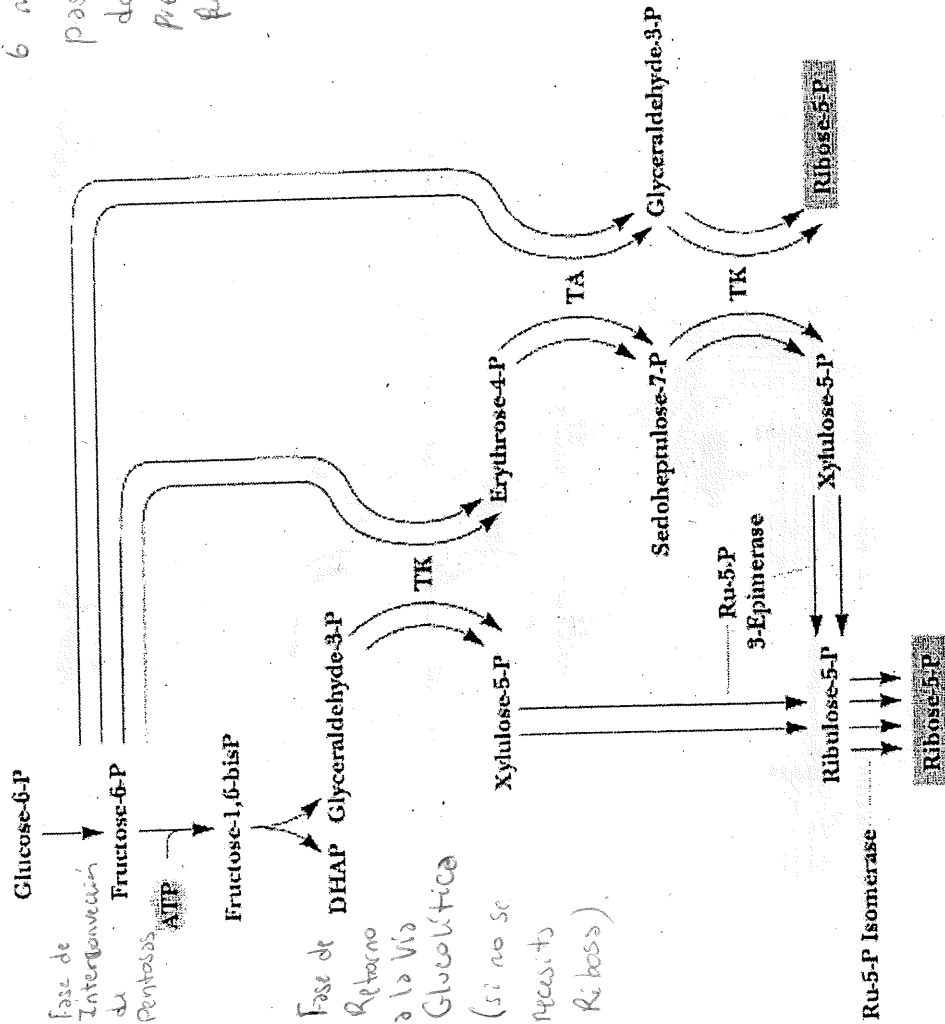
Via de las Pentosas

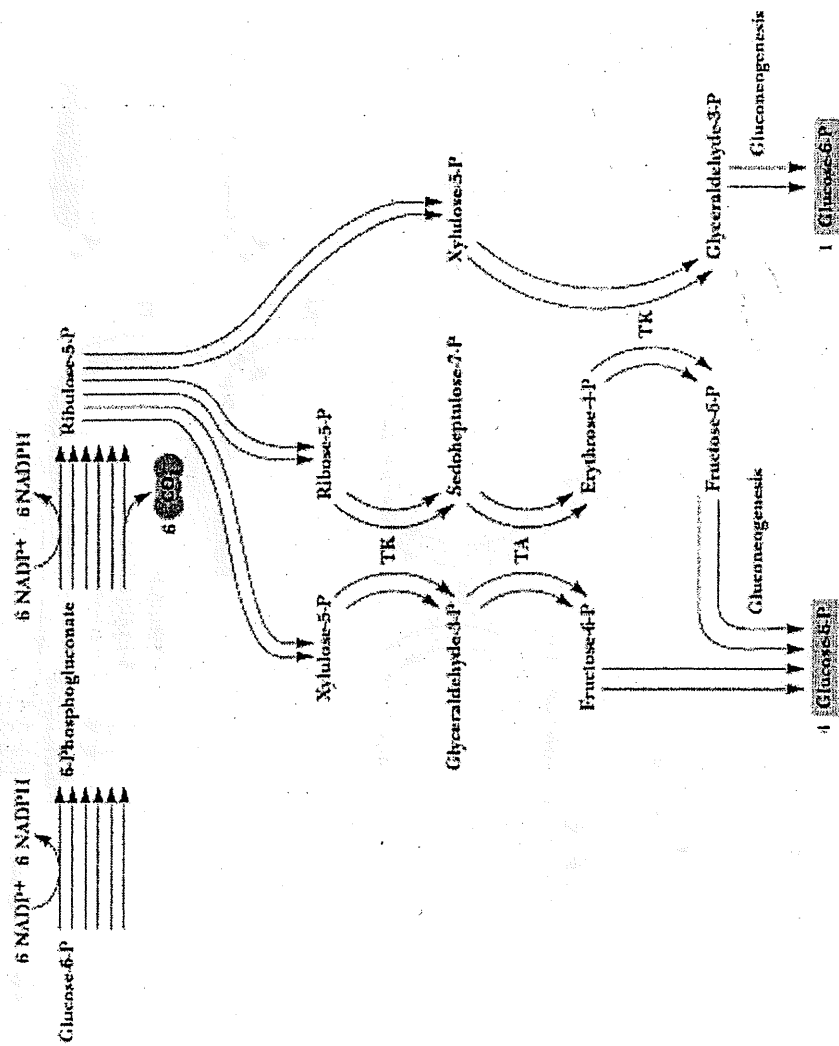
Principal fuente de NADPH en tejidos No fotosintéticos

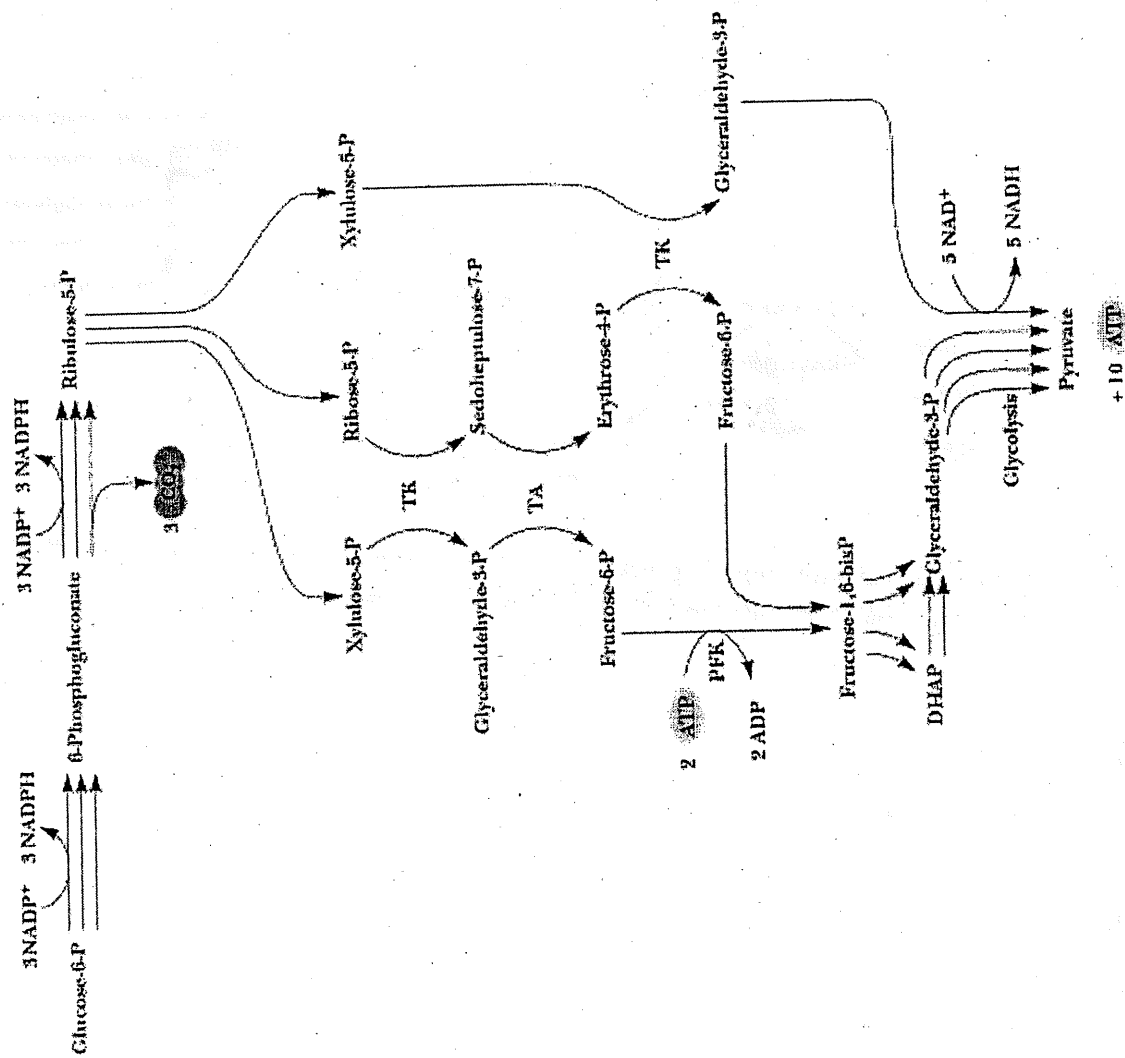
Resumen



6 moléculas de 5 Carbonos
pasan a formar 5 moléculas
de 6 Carbonos. Estos
pueden hacer glucólisis. (en caso
que no necesite Ribosa).







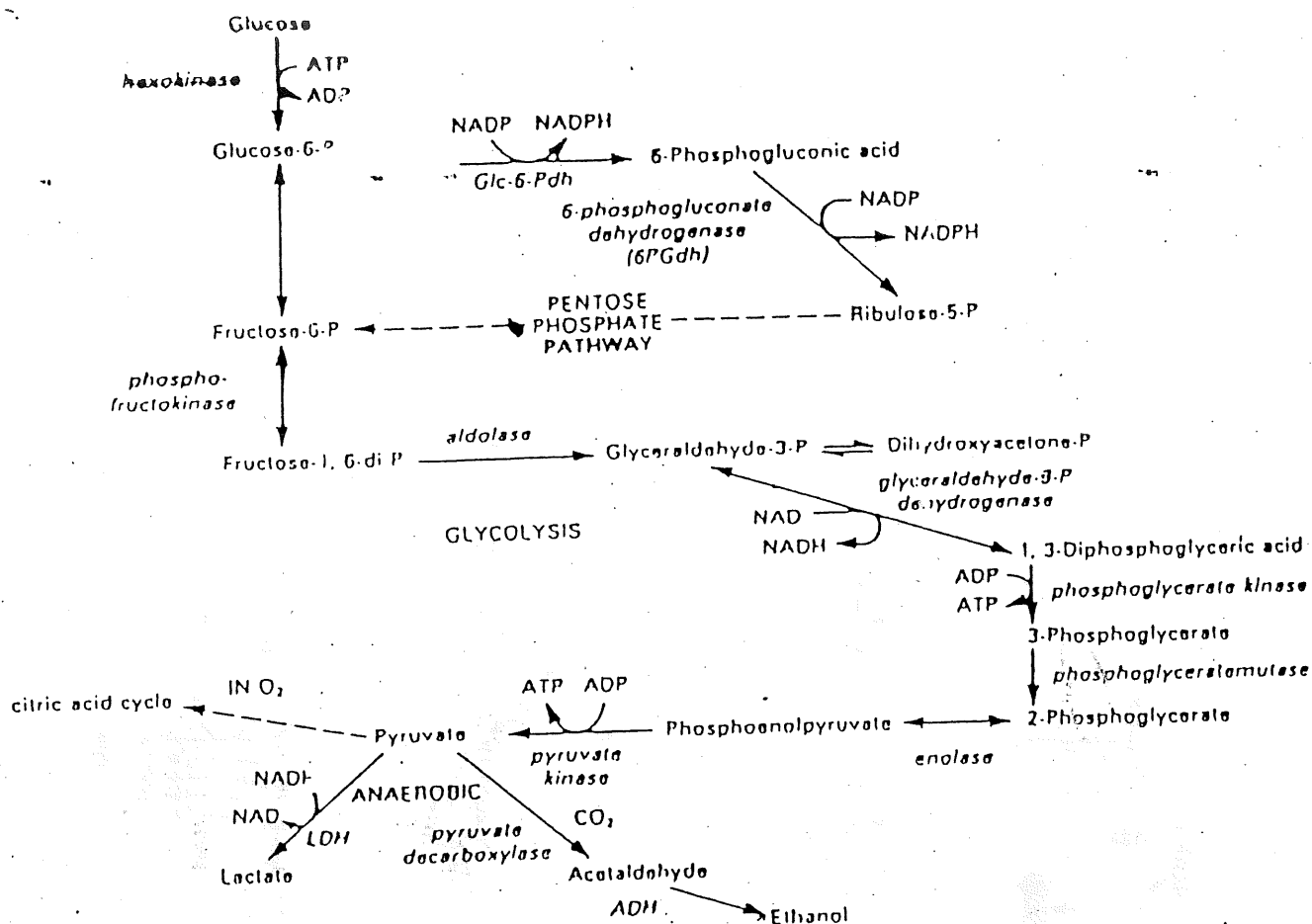


Figure 4.20. Some important steps in glycolysis and the pentose phosphate pathway (PPP) in relation to NADH, NADPH, and ATP production. Enzymes are in italics.

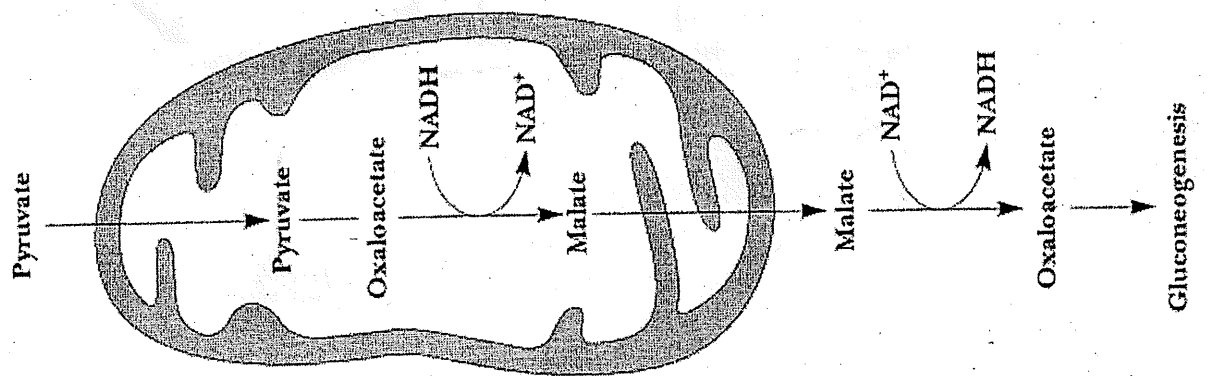
Lípidos

Mucha cantidad de Ácidos grasos Insaturados. Están en config. CIS y una

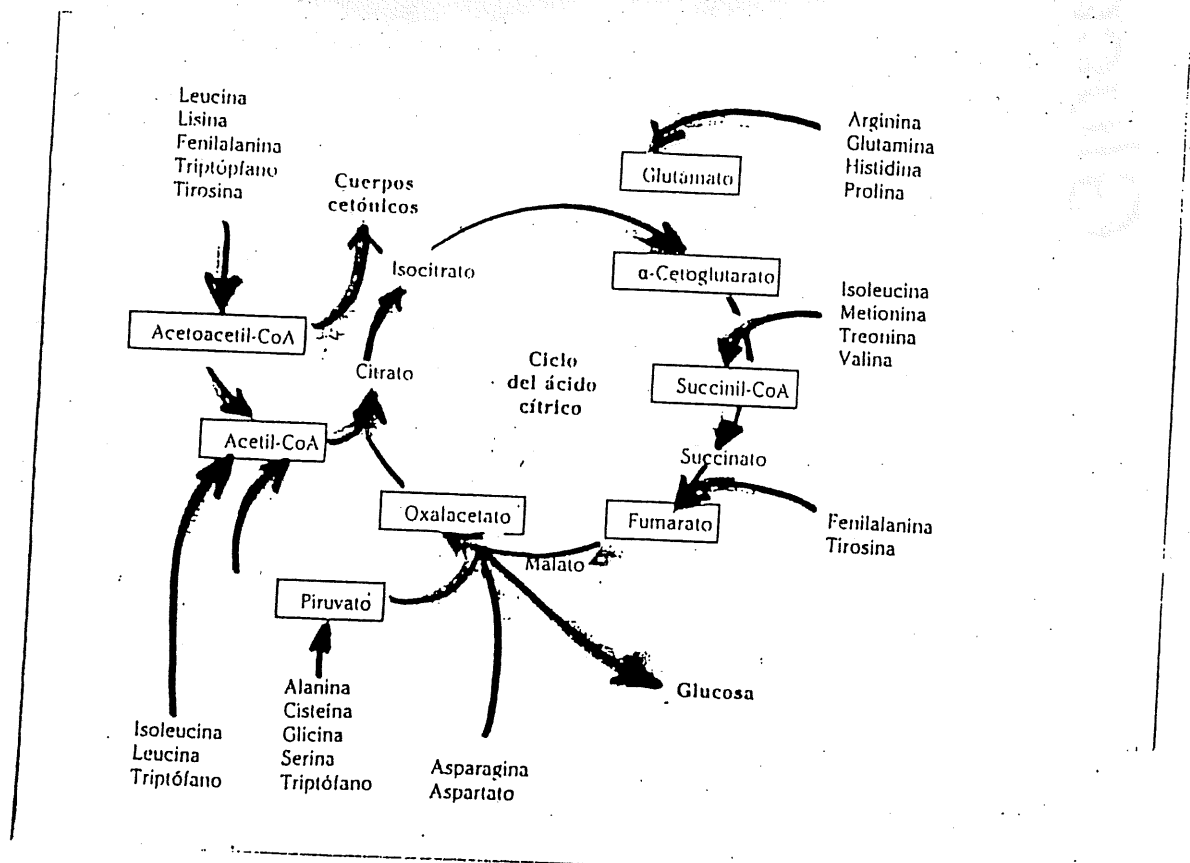
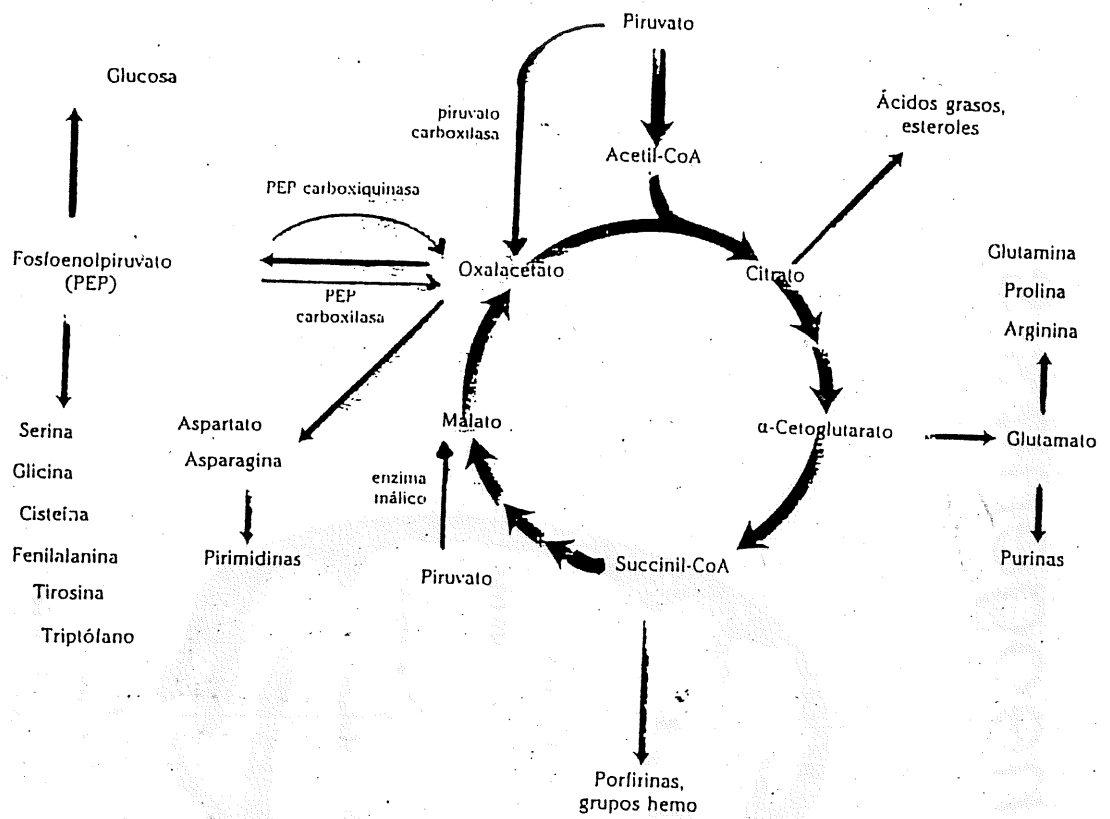
Isomerasa los pasa a TRANS. Así son β -oxidados.

La lipólisis tiene lugar en los cuerpos lipídicos. La β -Oxidación en el Glaciósoma.

Gluconeogenesis



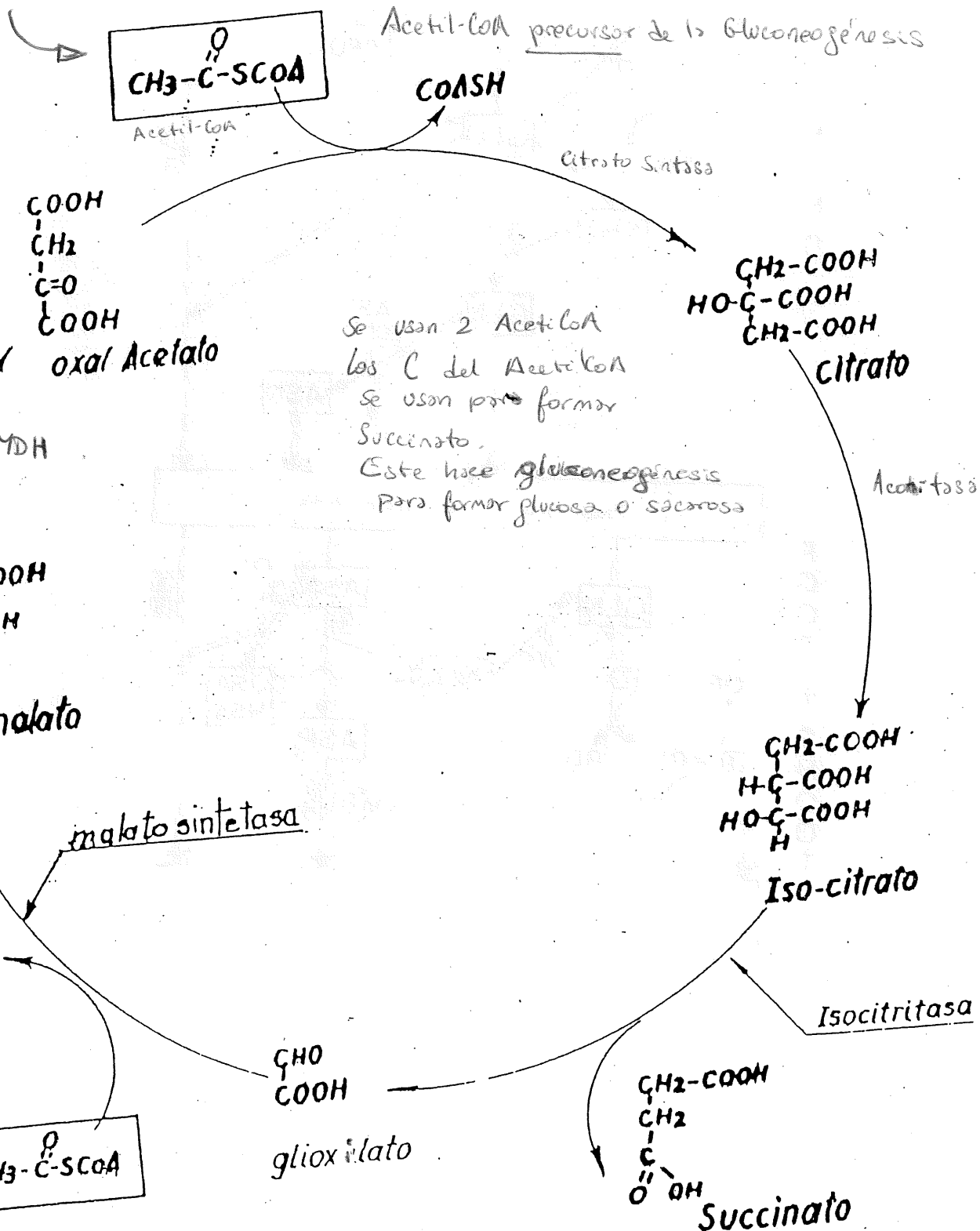
See next slide for 6 ATP



Ciclo del Acido Glioxílico

Se hace en el Glioxisoma de las plantas.

Degradación de Lípidos

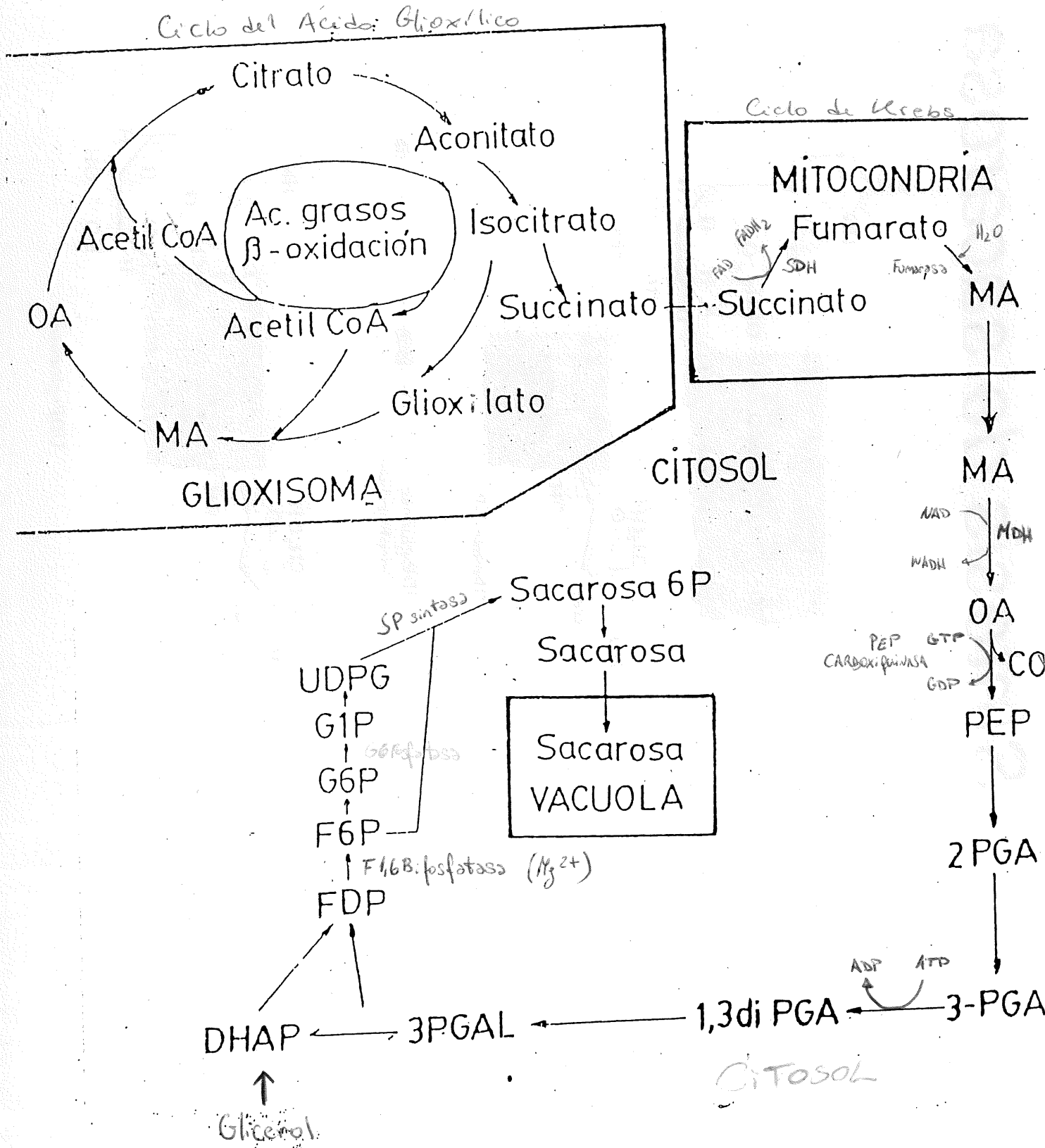


El Acetil-CoA no se degrada (como en Krebs) sino que forma parte del esqueleto carbonado.

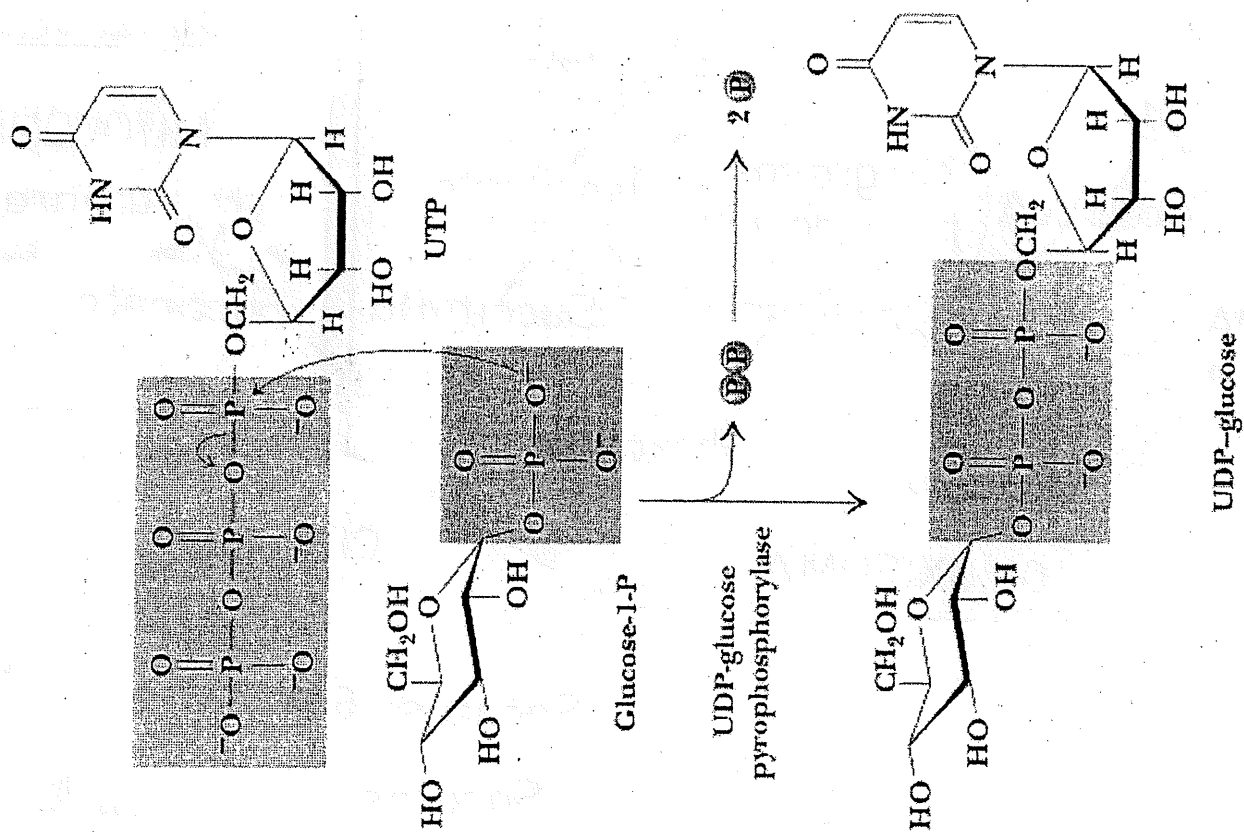
NEOGLUCOGÉNESIS

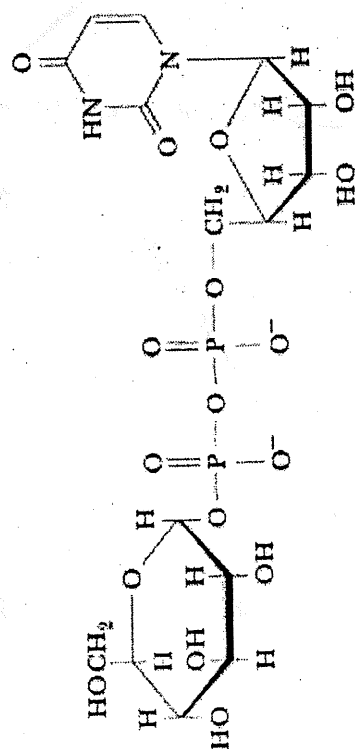
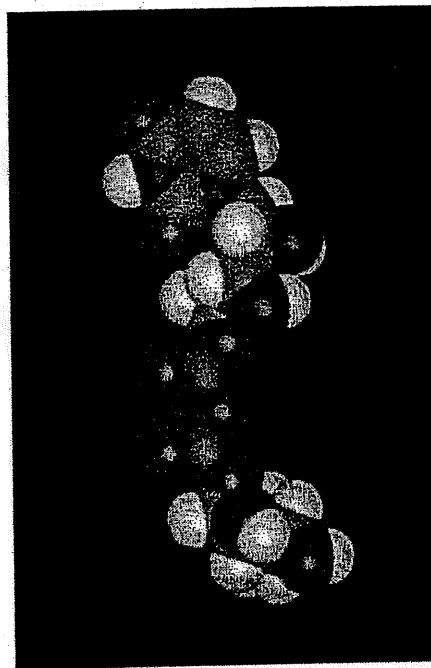
Gluconeogénesis

- Formación de azúcares a partir de precursores no hexosa (succinato y Acetil-CoA)
- 7 reacciones son iguales que en glucólisis



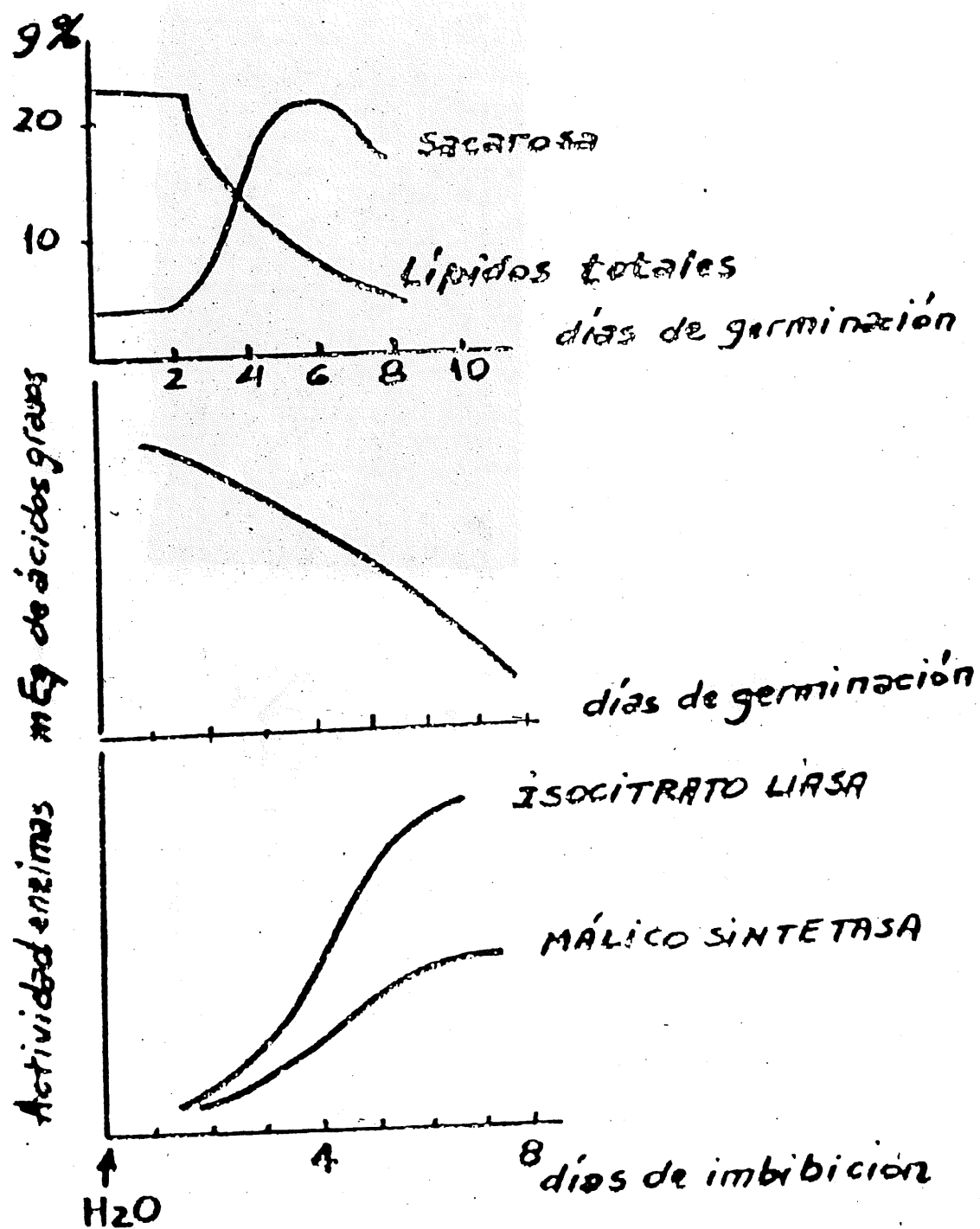
Síntesis de sacarosa





Uridine diphosphate glucose
(UDPG)

NEOGLUCOGENÉNESIS



BIOQUÍMICA DE LA GERMINACIÓN (CUESTIONARIO)

- 1) ¿Cuáles pueden ser las sustancias de reserva de una semilla?
- 2) ¿Qué etapas involucra el proceso de germinación?
- 3) ¿Qué factores intrínsecos y extrínsecos influyen en la germinación?
- 4) ¿Qué es el cociente respiratorio? ¿Cuál es su valor para un monosacárido, un lípido y una proteína? ¿Qué implicancias biológicas tiene?
- 5) Nombre y esquematice las dos rutas metabólicas de utilización del almidón durante la germinación.
- 6) En la hidrólisis del almidón en cariopses de cebada:
 - a. ¿Qué enzimas preexisten en la semilla madura?
 - b. ¿Cuál debe ser sintetizada durante la germinación? ¿Dónde se sintetiza? ¿Qué fitohormona regula su síntesis y cuál es su mecanismo de acción?
- 7) En la germinación de semilla de arveja:
 - a. ¿Cuáles son los azúcares de reserva utilizados inicialmente?
 - b. Formule un ejemplo indicando sustrato, enzimas y productos.
- 8) ¿Qué importancia tienen las fosforilasas en las primeras etapas de la germinación en semillas de arveja?
- 9) ¿Cuáles son los posibles destinos metabólicos de los productos de degradación de los polisacáridos de reserva?
- 10) En la etapa final de la germinación:
 - a. ¿Cuál es la fuente principal de fósforo utilizada?
 - b. ¿Cuál es el destino principal del fósforo?
- 11) Respecto de la utilización de reservas proteicas:
 - a. ¿Qué enzimas catalizan la hidrólisis de proteínas y/o polipéptidos?
 - b. Nombre las características diferenciales de estas enzimas con respecto a su modo de acción.
- 12) Respecto a la utilización de reservas lipídicas:
 - a. ¿Qué organelas subcelulares están implicadas en su utilización?
 - b. Indique las etapas metabólicas que ocurren en cada una.
 - c. ¿Qué enzimas se inducen durante este proceso?
- 13) ¿Qué causas físicas, fisiológicas y bioquímicas impiden la germinación de una semilla madura?

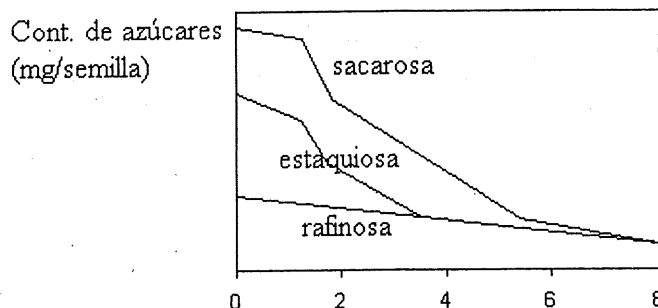
- 14) Respecto de la vía de las pentosas fosfato:
- ¿Cuál es la localización celular de esta vía?
 - ¿Cuáles son las reacciones que implican la conversión de glucosa-6-fosfato a pentosa fosfato?
 - ¿Cómo se denominan las enzimas que catalizan la reacción y a qué clase pertenecen en la clasificación decimal de enzimas?
 - ¿Cuál es la coenzima?
- 15) ¿Cuál es el destino metabólico de los productos de la primera etapa? Considere tanto el metabolito con el que esta etapa concluye como la utilización posterior de las coenzimas reducidas.
- 16) ¿Cuáles son las enzimas y los cofactores que intervienen en la etapa no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato?
- 17) ¿Cuáles son las funciones primordiales que cumple esta vía metabólica en la germinación?

GERMINACIÓN (PROBLEMAS INTEGRADORES)

1) Explique los cambios que se producirán en los contenidos de lípidos, carbohidratos y proteína en cotiledones de plántulas de joroba (cuyas semillas reservan los tres tipos de nutrientes) durante 30 días después de la imbibición de las semillas. Indique proceso metabólico, ubicación celular y enzima más importante para los tres tipos de nutrientes, y si esperaría que sus concentraciones en el tejido cotiledonar aumenten o disminuyan.

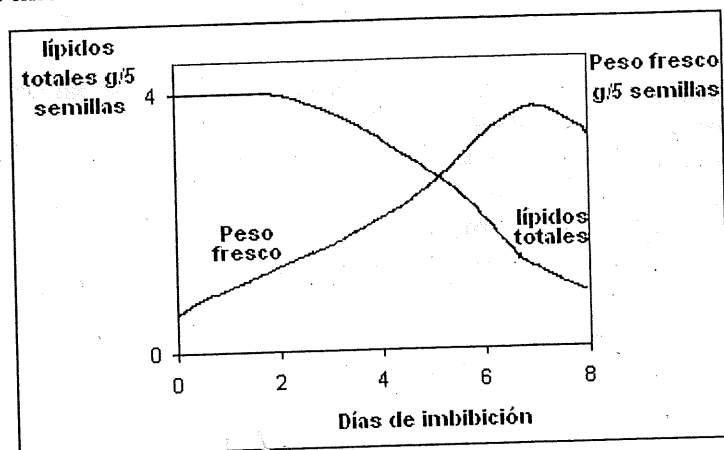
2) Las semillas de mostaza (*Sinapis alba*) presentan en sus cotiledones sacarosa (disacárido), rafinosa (trisacárido = gal-glu-fru) y estaquiosa (tetrasacárido = gal-gal-glu-fru).

a) Explique en el siguiente gráfico la disminución del contenido de esos azúcares en plántula entera en función del tiempo de imbibición.



- b) Sobre el mismo gráfico, dibuje un par curvas que representen, estimativamente, el contenido de fructosa y glucosa en función del tiempo.
- c) ¿Qué clase de enzimas catalizan la degradación de azúcares de la figura?
- d) ¿Cuáles son los destinos metabólicos de glucosa y fructosa en la planta?

3) Explique el siguiente gráfico que representa los cambios ocurridos en semillas de ricino desde la imbibición



a) ¿A qué se debe la disminución de lípidos totales? ¿Qué vía (o vías) metabólicas estarán activas?

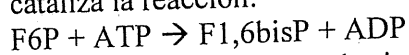
b) ¿A qué atribuye los cambios en el peso fresco?

c) ¿Qué enzimas del endosperma se activan para justificar el aspecto de la curva de lípidos totales? ¿En qué día de la germinación, estima, comienza a activarse?

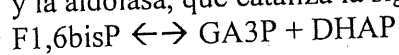
d) ¿Cuál es el producto final de la conversión de lípidos de las semillas con reservas lipídicas?

e) Indique las reacciones particulares que posibilitan esta transformación. Indique sustratos, productos y enzimas.

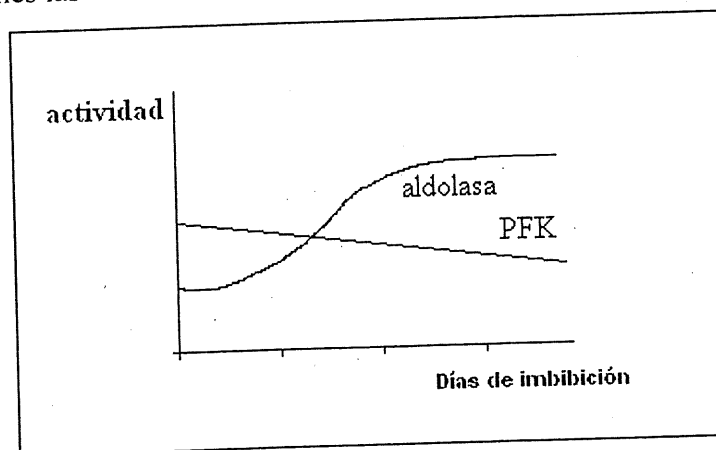
4) En semillas de algodón (reserva lipídica) en germinación se determinaron las actividades de dos enzimas propias de la glucólisis: la fosfofructoquinasa (PFK) que cataliza la reacción:



y la aldolasa, que cataliza la siguiente reacción:



En los cotiledones las curvas resultantes fueron las que indica la figura. Responda:

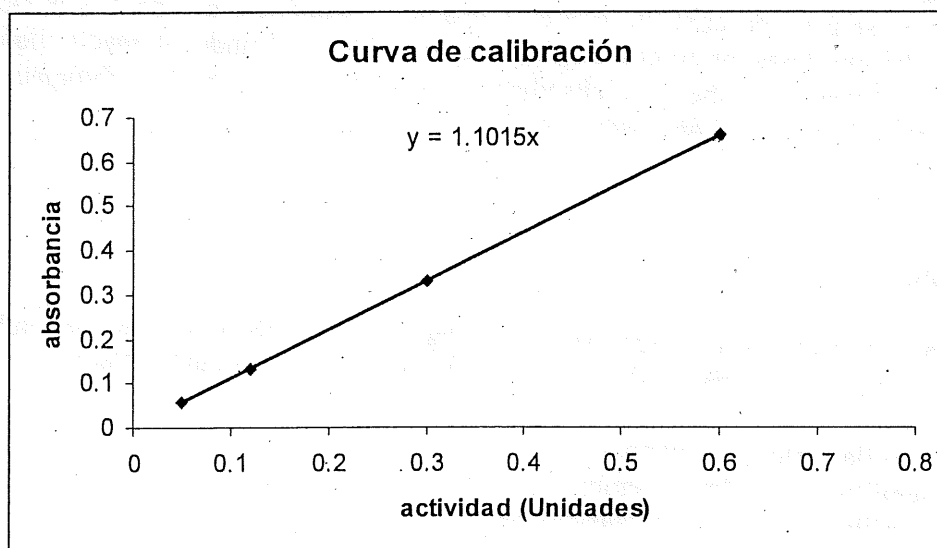


- 7- El sobrenadante se pasa a una cubeta de 1 mL y se lee en espectrofotómetro a 620 nm contra un blanco que se realiza con 1 mL de buffer acetatos, 250 μ L de medio de incubación y 250 μ L de NaOH 0,5 M.

RESULTADOS:

Tratamiento	Semillas enteras incubadas	Semillas sin embrión	Semillas s/ embrión con ácido giberélico	Semillas sin incubar (control)
Absorbancia				
Actividad amilásica (UI/semilla)				

Curva patrón.



TEMA 9 : INFORMACIÓN GENÉTICA

ESQUEMAS

CONTENIDOS

- Duplicación de ADN
- Transcripción.
- Traducción. Biosíntesis de proteínas
- Regulación de la transferencia de información genética
- Aplicaciones biotecnológicas

El ARN se puede Replicar y hacer una transcripción Inversa a ADN.

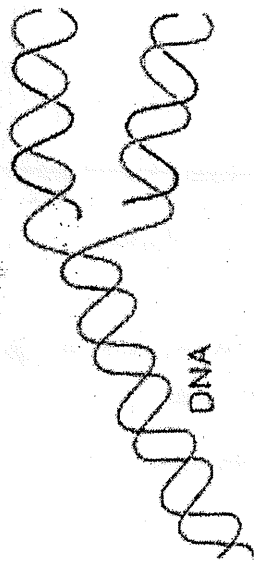
Código Genético: permite asociar un codón con un a.a. Es el que permite la Traducción. Es degenerado porque hay 64 combinaciones y solo 20 a.a.

El ADN está estabilizado por Histonas y otras Proteínas.

La Mitochondria y el Cloroplasto tienen su propio genoma y sus propios mecanismos de Replicación y Transcripción.

“Central Dogma” of Biology

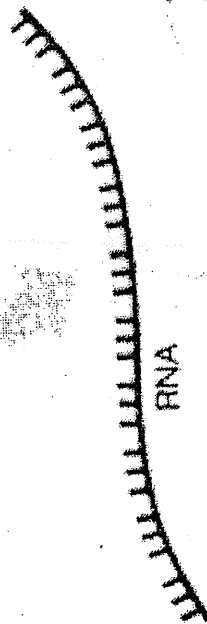
Replication



DNA can replicate

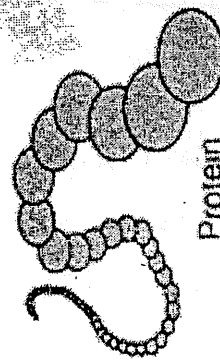
DNA can be transcribed into RNA

Transcription

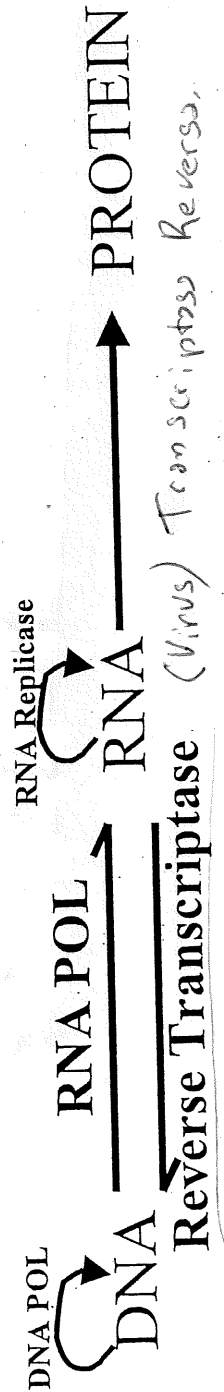


mRNA can be translated into protein sequences

Translation



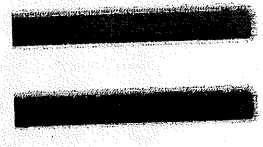
Proteins determine our phenotype



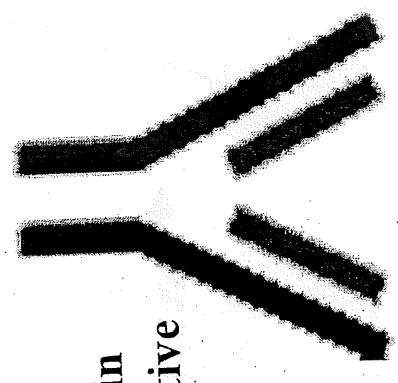
Seremos repetidos reconocidos por la
Enzimas RecA que abre la hélice

A. DNA: DOUBLE TEMPLATE MOLECULE

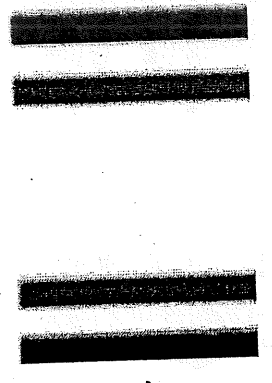
1. Strands separate, each becoming template for assembly of a complementary strand



Parental
Duplex



Intermediate in
semiconservative
replication



Two daughter
Duplexes

RESULT: TWO IDENTICAL MOLECULES
FROM ONE:

Replicón o Replisoma: conjunto de enzimas que dan la replicación.
Se incluyen la cadena de ADN, ADNc y nucleótidos.

2. Replication is "semi-conservative"

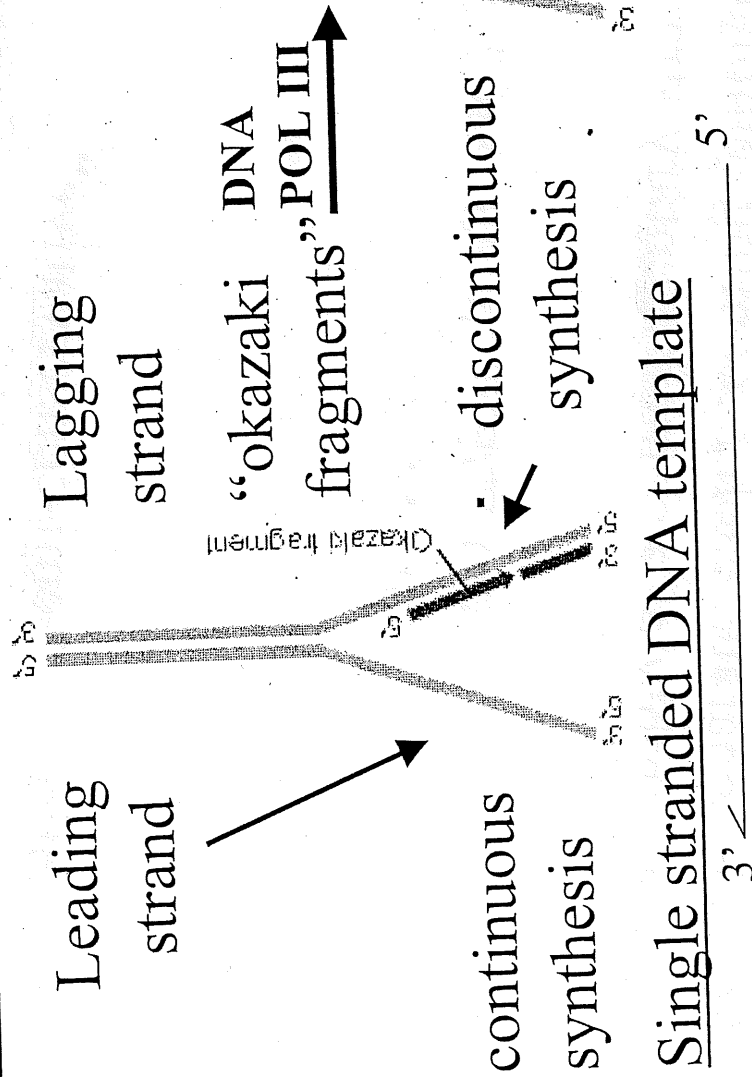
Meselson-Stahl experiment confirmed basic hypothesis. Parental strands are conserved during subsequent rounds of replication.

DNA REPLICATION

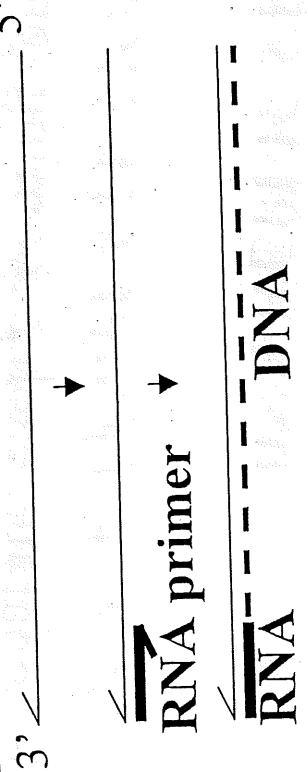
Proceso Endergónico. La energía proviene de los nucleótidos triP y los flecos de H. La Ribosifosfata aporta nucleos Energía. Son reacciones acopladas que hacen el proceso global exergónico.

3. Base pairing rules completely dictate the sequence of the newly synthesized strand

Some Features of Replication

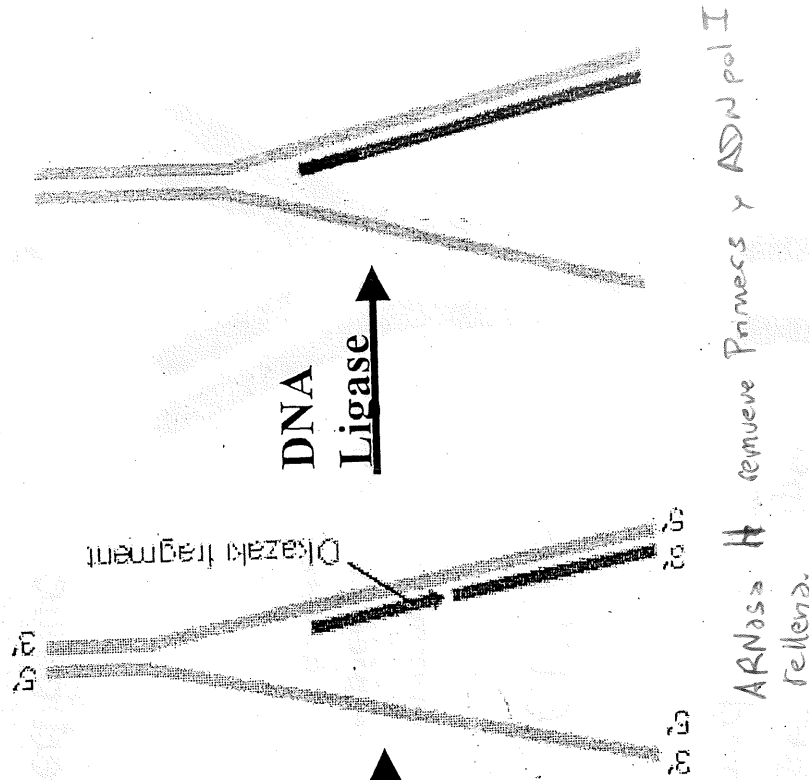


Single stranded DNA template

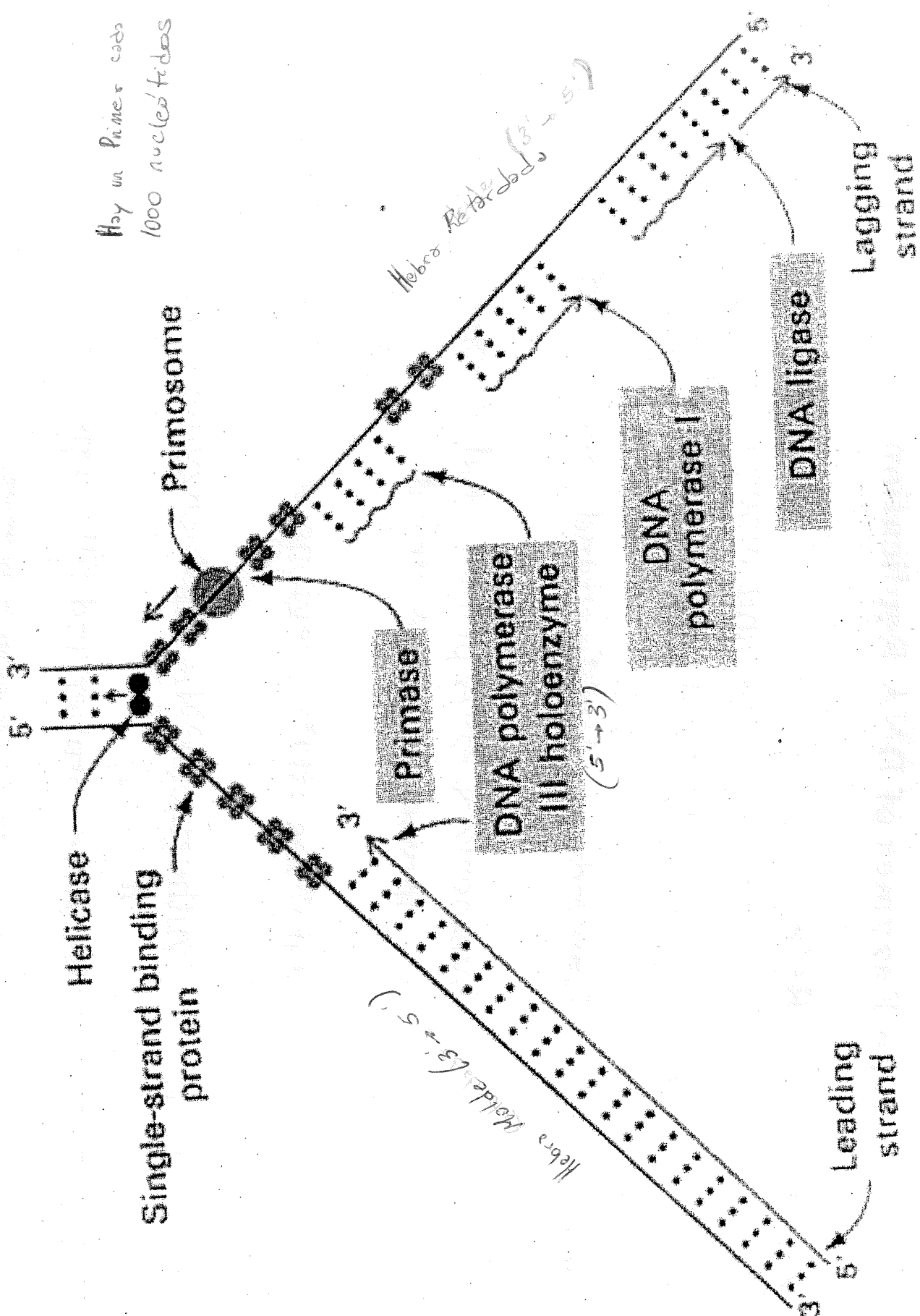


Attached by primase (part of primosome)

Newly synthesized strand. RNA primer is removed by RNase H and gap is filled by DNA polymerase I



Se necesitan Primers porque la ADN pol no
puede sintetizar nucleótidos con el extremo 3'
libre.



The Enzymes of DNA Replication

Enzyme Role

Topoisomerase

Initiates DNA coil and supercoil unwinding by introducing nicks. (E.coli - DNA gyrase)

Topoisomerasa I: Hace la Replicación

Topoisomerasa II: Gira

*Abre la Helice y hace la
Borbuja de Replicación*

Helicase

Unwinds the double strand once nicked.

Primase

Synthesizes RNA primers and attaches it to unwound ssDNA strand.

SSBP

*Proteínas de unión a ADN
de Simple Cadena o Proteínas Desestabilizadoras*

Stabilizes ssDNA regions *Mantienen las cadenas separadas*

DNA POL III

Synthesizes DNA (holoenzyme- 10 proteins) (Mg^{2+})

DNA POL I

Removes primer and fills gaps *Reemplaza Primers por ADN.*

*Es una exonucleasa (tanto 3' a 5' como 5' a 3')
También es endonucleasa (no comienza por los extremos)*

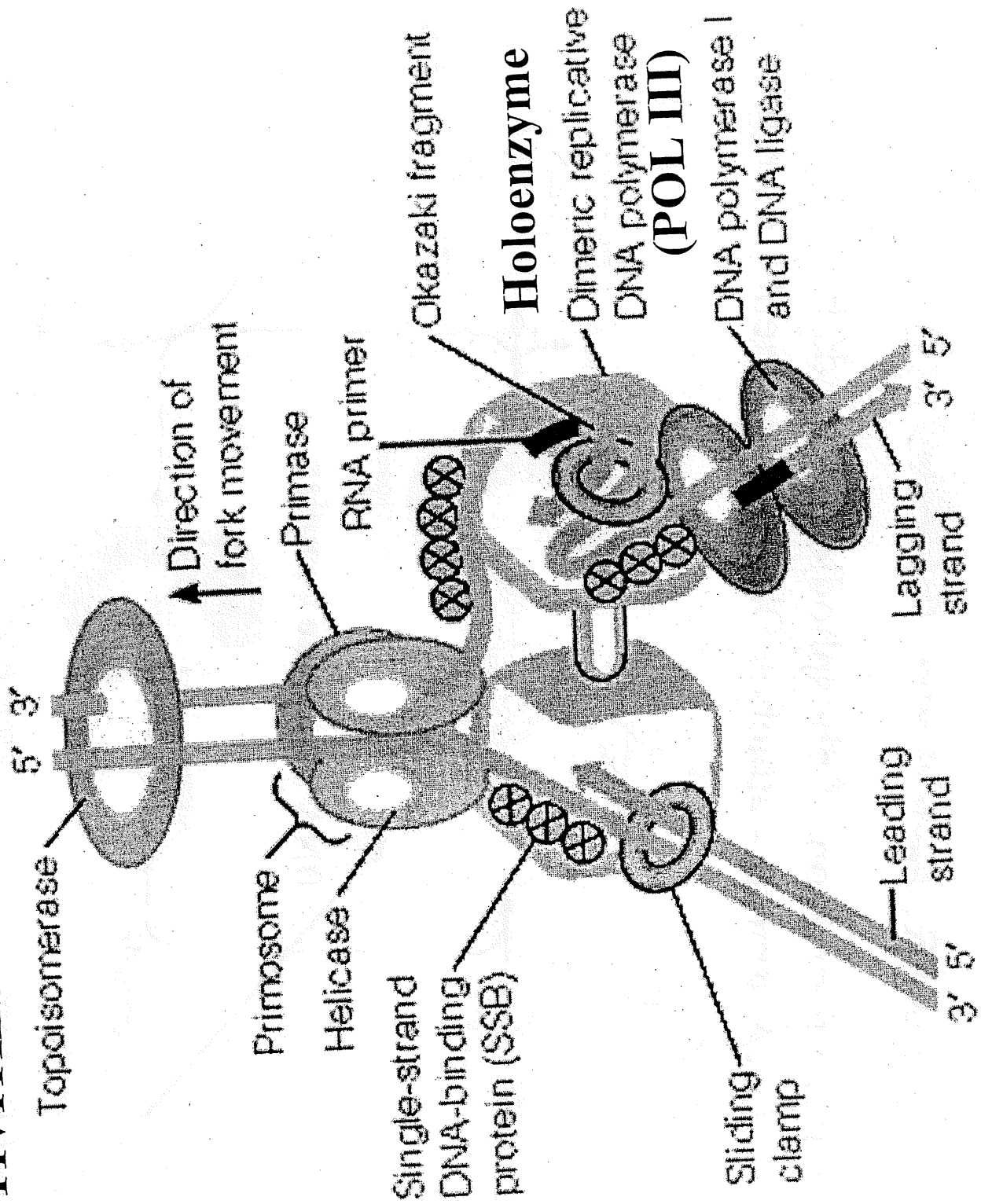
DNA Ligase

Joins the ends of DNA

Une los huecos (gaps) entre el primer reemplazado y el ADN.

DNA REPLICATION

B. ACTIVITIES AT THE REPLICATION FORK

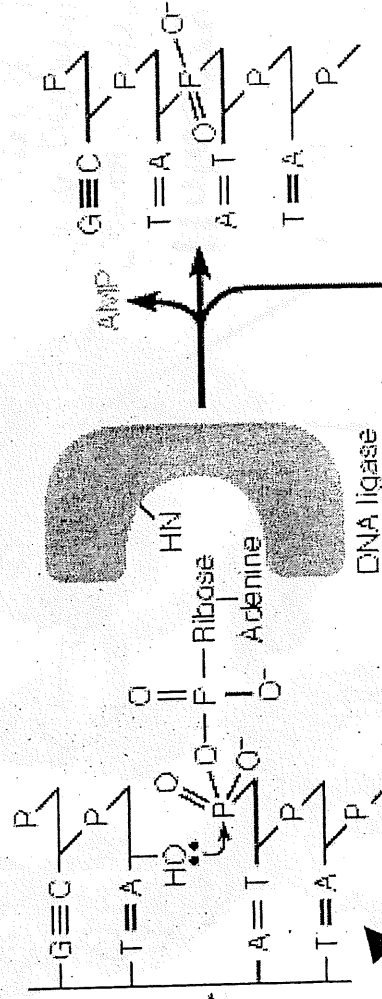
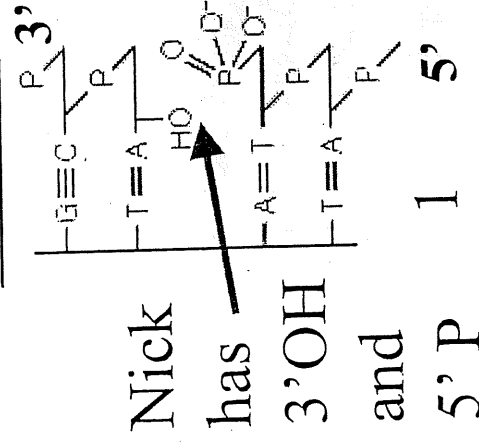


C. DNA LIGASES

Femento el enlace Resfordiester.

1. Catalyze formation of phosphodiester bonds between adjacent DNA strands - attaches Okazaki fragments to lagging strand.

2. Reaction



DNA adenylate complex

Nucleophilic attack of 3'OH on the activated P atom

Adenylate enzymes
Enz-AMP
(activated)

AMP attached to lysine in enzyme

Energy:

T4 phage and eukaryotes - ATP

E. coli - NAD

ATP (in T4 and eukaryotes)
NAD⁺ (in E. coli)

PP_i (in T4 and eukaryotes)
Nicotinamide mononucleotide (in E. coli)

Transcripción

El promotor indica dónde comienza la Transcrip.

El comienzo de la Transcrip. está indicado por el primer nucleótido transcrito.

La ARN pol. tiene afinidad por el Promotor.

Es lo que abre la hélice.

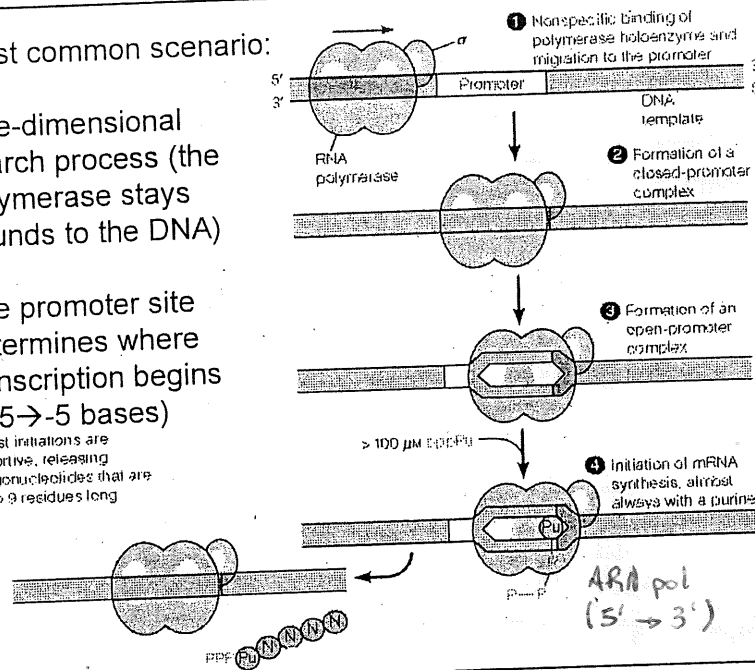
→ Nucleótido +1
(Punto de Inicio)

Most common scenario:

One-dimensional search process (the polymerase stays bounds to the DNA)

The promoter site determines where transcription begins (-55 → -5 bases)

Most initiations are abortive, releasing oligonucleotides that are 2 to 9 residues long



Se libera Pirofosfato, entra la Pirofosfatasa, que hace la reacción exergónica.

Topoisomerasa I
Elimina el
Superenrollamiento

Híbrido ARN-ADN
con 8 pares
de bases.

Promotor TATA BOX
10 nucleótidos antes
de la Transcrip.

Hay promotores
fuertes y
débiles y
dependen
que se transcriba
el gen con más
facilidad.

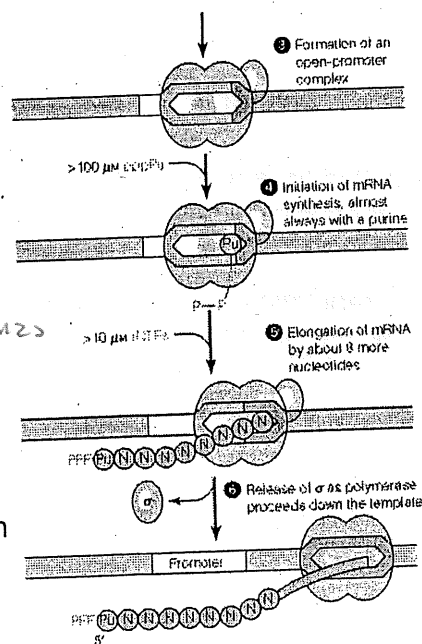
Transcripción → se forma ARN 5' → 3'

Transcription start site is defined as the first DNA nucleotide which is transcribed into RNA

Successful transcription requires release of the σ subunit

Transcription stops based on sequence or interference by the ρ protein

Transcription and translation happen concurrently in prokaryotes



Hacen falta
Cofactores
 Mg^{2+} o Mn^{2+}

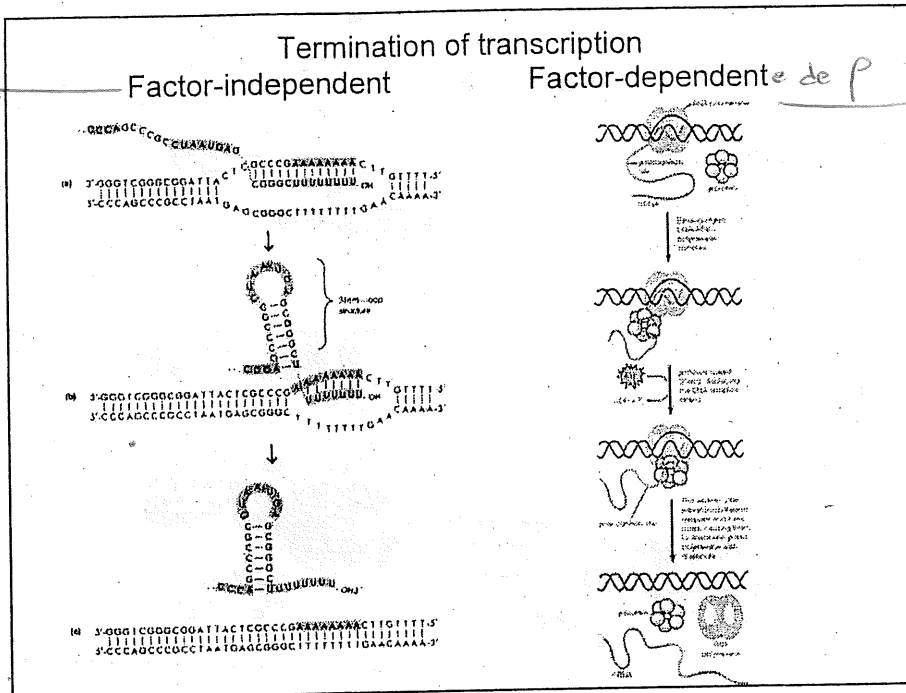
La Transcripción y Traducción ocurren simultáneamente en Procariontes

Hay una señal que termina con la Transcrip. formándose el Transcrito Primario.

Hay σ específicos. Como σ_{70} que reconoce ciertas secuencias.

La Terminación de la Transcrip. Puede depender de la proteína P o no depender.

Secuencias GC, repetitivas, seguidas de varias A, forman un bucle en el ARN y la ARN pol no puede avanzar más. Además la unión A-U es muy inestable, por lo que también se separa el ADN del ARN.



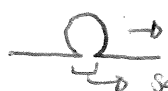
La proteína P se une al ARN y se desliza hasta el final con gasto de ATP. Allí libera al ARN P inactiva a la ARN pol.

Elements of a successfully transcribed mRNA

- 5' leader sequence of 25-200 nucleotides with a ribosome binding sequence
- Translation start codon AUG which encodes the amino acid methionine
- Translation stop codon: UAG, UAA, or UGA
- In eukaryotes there are also intervening sequences called introns which are removed prior to translation

(RNP_{pn})

ARN_m inmaduro. Se eliminan los intrones.
Los extremos se protegen con un casaca y cola PoliA.
El proceso de maduración o Splicing (corte y empalme).



→ los intrones se enrollan

→ se desunen los exones y se unen, liberando el intrón.

Esplíceosoma: conjunto de intrones, exones y enzimas que intervienen en el proceso.

El ARNm sale por los poros de la membrana nuclear.

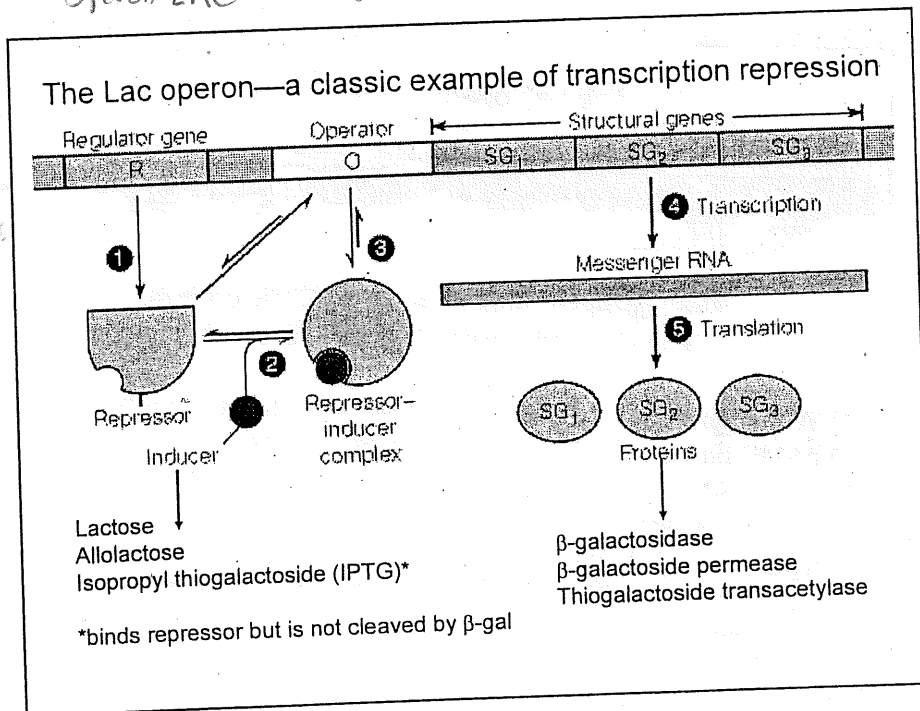
More on transcriptional regulation

- The promoter is where the RNA polymerase binds initially contains consensus sequences of 6 nucleotides each at 35 and 10 bases before the transcription start site
- These promoters can vary in groups (different σ proteins)
- Protein expression is generally regulated at the transcriptional level
- Some enzymes are constitutively transcribed
- Inducible enzymes are synthesized based on need
- Coordinate induction refers to transcription of polycistronic mRNA which contains the sequences for more than one enzyme in a particular metabolic pathway

Operon LAC → Inducción de la Transcripción

Se une un Represor al operador
Si no hay glucosa, se
reprime la síntesis de
glucosa.

Operador:
Si en el medio
hay glucosa, se
une el represor
pero no se
transcriben los genes
estructurales.



(-) Glucosa
↓
(+) AMPc

En medio sin Glucosa se activa este Operon.

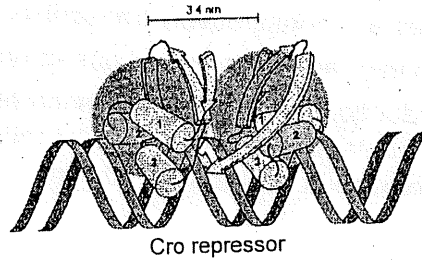
La Lactosa se une al Represor y cambia su conformación. Así se separa del Operador.

The Lac operon has symmetry

TGTGTGGAATTCTGAGCGGATAACAATTTACACA
ACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGT

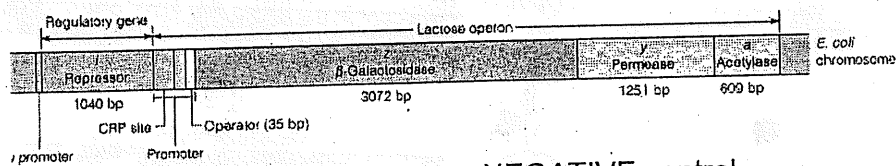
Protected by repressor

This symmetry corresponds to the two-fold symmetry of the tetrameric lac repressor "helix-turn-helix DNA binding motif"



AMP_c se une con
CRP y forma
CRP-AMP_c que
se fija al promotor
y estimula la
transcripción (sino
by Repressor)

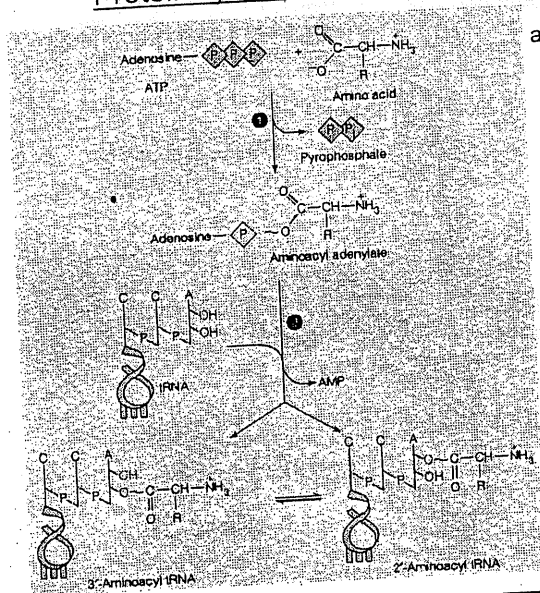
The Lac operon—the details



The repressor acts as a **NEGATIVE** control
The CRP site exerts **POSITIVE** control

- 1) When [glucose] ↓, [cAMP] ↑ (cAMP is a "hunger signal")
- 2) cAMP binds to CRP ("cAMP receptor protein")
- 3) CRP-cAMP binds to the CRP site in the promoter region of the Lac operon
- 4) Then RNA polymerase can bind to the promoter entry site
- 5) If operator is NOT occupied by a repressor, transcription proceeds

Protein synthesis: activation of amino acids



a) Aminoacyl-tRNA synthetase binds amino acid + ATP to yield enzyme-bound adenylated amino acid



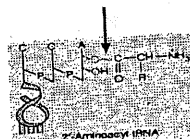
b) tRNA binds to the adenylated a.a.-synthetase complex and the amino acid is transferred to the 2' or 3' OH of the 3'-terminal residue of the tRNA

Se Adenila el a.a.
Usando ATP y liberando PPi.

Ello es adenilado por el AARS, liberando AMP y Adenilo.

c) Activation....

The ester bond in aatRNA has a free energy of hydrolysis ~ ATP terminal PO_4



d) Requisite specificity of aatRNA synthetases

- 1) for tRNA (>20)
- 2) for amino acid (~20)

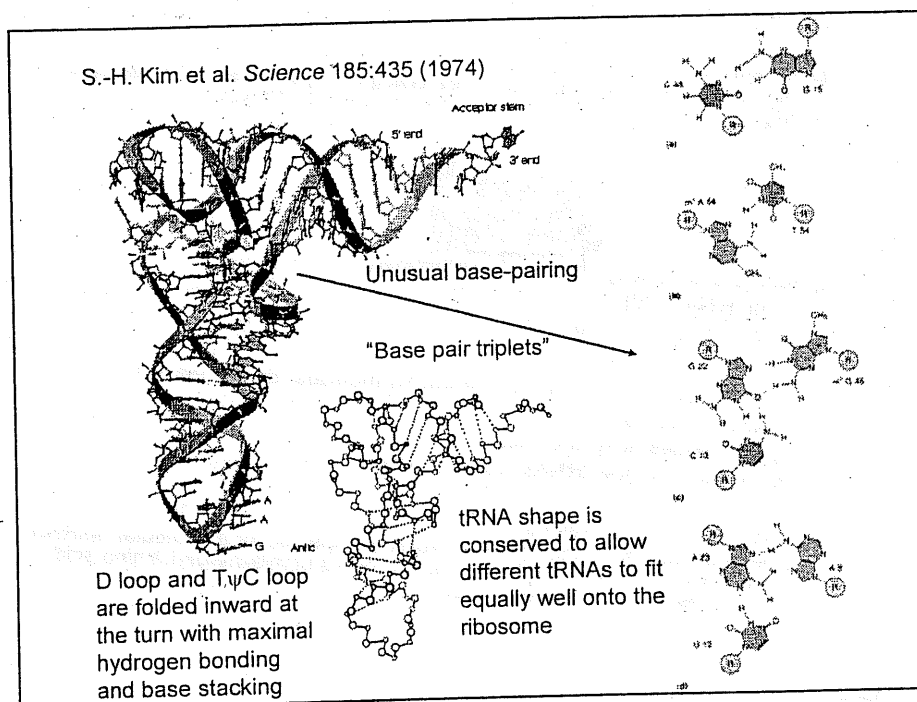
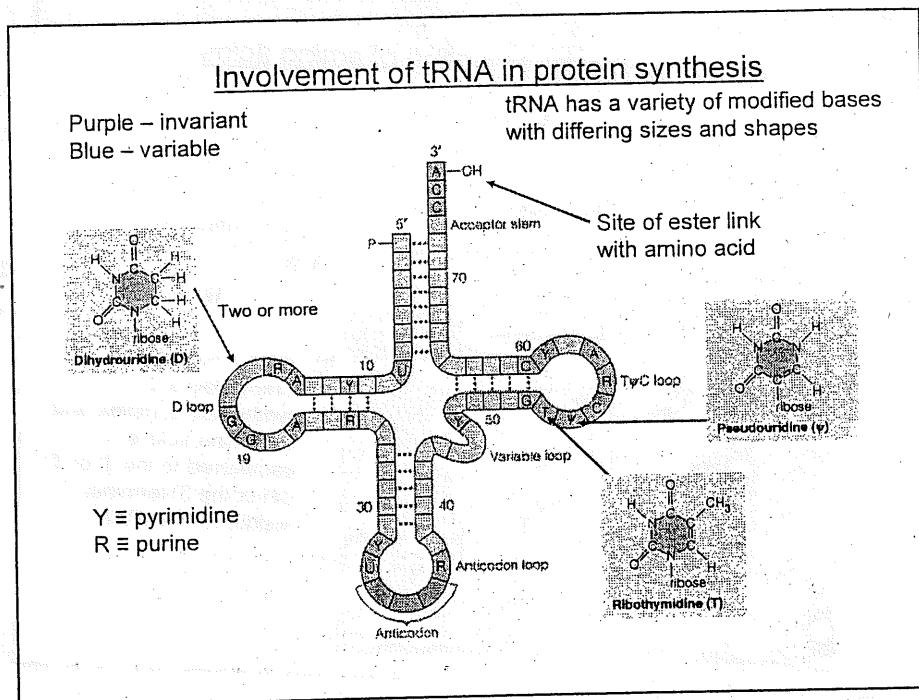
∴ there must be at least 20 different synthetases (*E. coli* has 21)

- 1) active sites vary
- 2) two classes of synthetases
- 3) variations in how tRNAs are recognized

e) Accuracy and proofreading

The anticodon and other bases in tRNA are specific for a particular aatRNA synthetase. Cognate tRNAs induce hydrolysis of mischarged amino acid adenylates $\rightarrow 10^{-5}$ error frequency

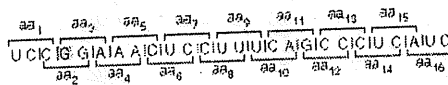
La subunidad
pequeña se une
al ARNm.
Se ve por
seres complementarios
con ARNr.



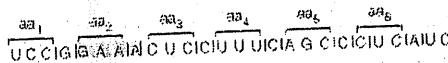
Transfer { Peptidil - ARNt - sintetasa reconocen los anticodones y codones
Aminocil - ARNt - sintetasa

Deciphering the genetic code

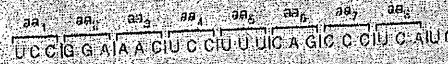
- > Which codons encode which amino acids?
- > How is the code read? (Francis Crick & Sidney Brenner 1961)



(a) Overlapping code. There will be statistical regularities between adjacent amino acid residues. Point mutations (red) will be able to change two amino acid residues.



(b) Punctuated code. Deletions of four nucleotides (or multiples thereof) will restore the reading frame.



(c) Unpunctuated code. Deletions of three nucleotides (or multiples thereof) will restore the reading frame. This is the actual form of the code.

- > point mutations (single nucleotide) change only one amino acid
- > one or two nucleotide deletions produce nonsense proteins
- > three nucleotide deletions remove one amino acid

Genetic Code

tRNA is an "adapter molecule between nucleotide "language" and amino acid "language"

- Coding ratio: 3 nucleotides / amino acid
- Codon assignments:
 - 4 bases, taken 3 at a time
 - $4^3 = 64$ possible combinations
 - 61 codons encode (usually) for 20 amino acids
 - 3 codons are (usually) stop signals
- Redundant – More than one codon for all amino acids except Met and Trp
- Non-ambiguous – A given codon specifies one and only one amino acid
- Non-overlapping – The ribosome must maintain a reading frame of three bases at a time to properly translate mRNA. On some rare occasions, depending on structural properties of the mRNA, four bases may be "read"

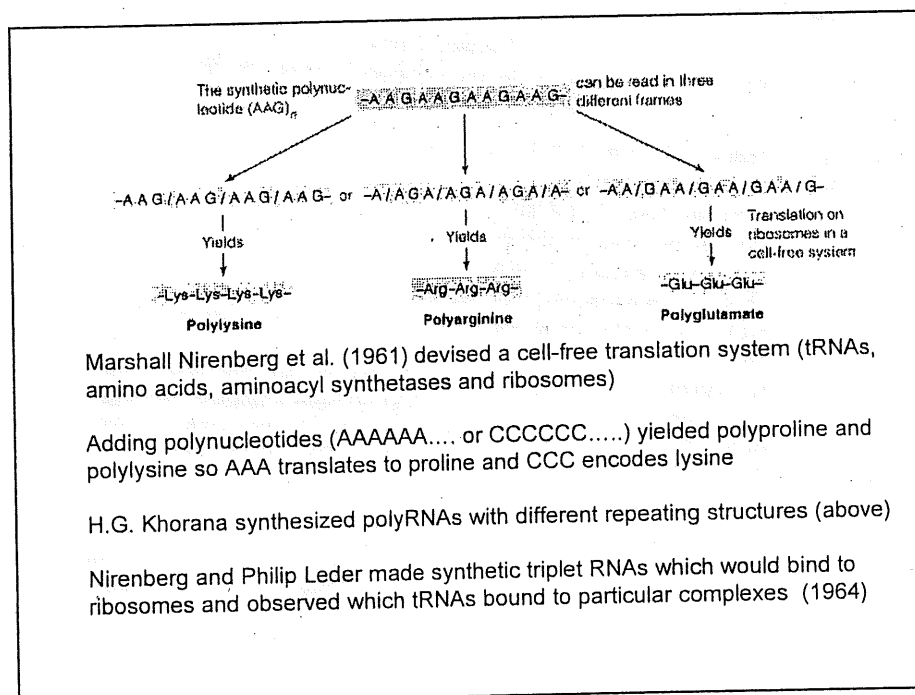
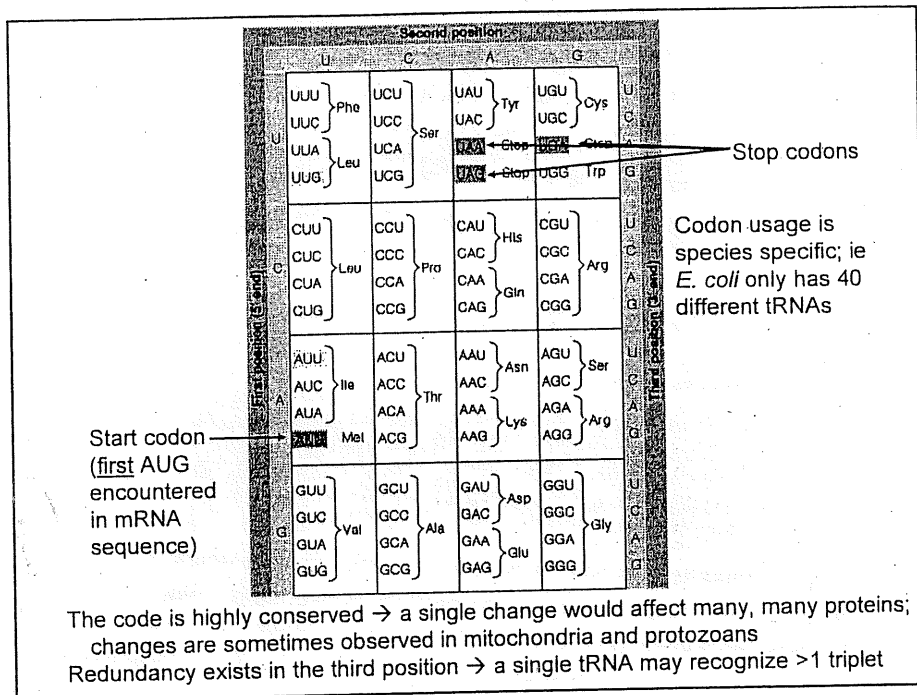
CATGAG

vs.

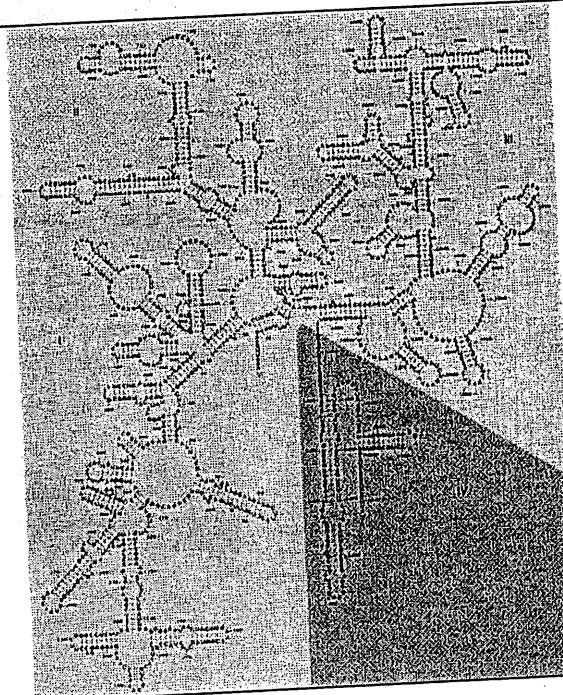
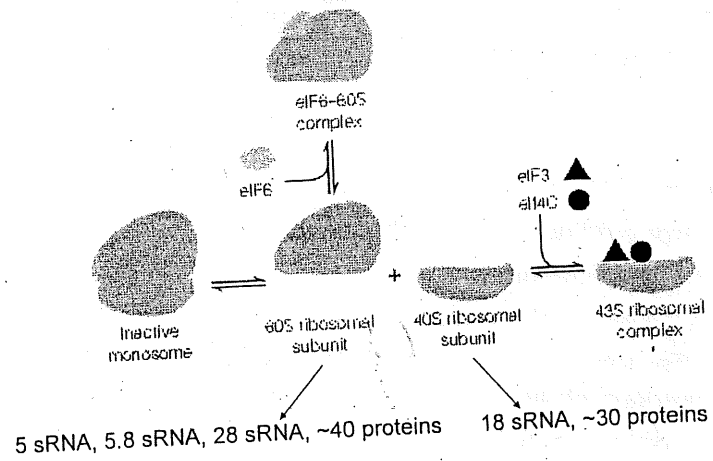
CATGAG

This would cause statistically favored amino acid combinations

Degenerado
No Ambiguo
No Saltado
(Método de lectura)



Eukaryotic ribosomes



rRNA: three major classes
 1) Eukaryotes
 2) Prokaryotes
 3) Archaeobacteria

Protein synthesis requires energy

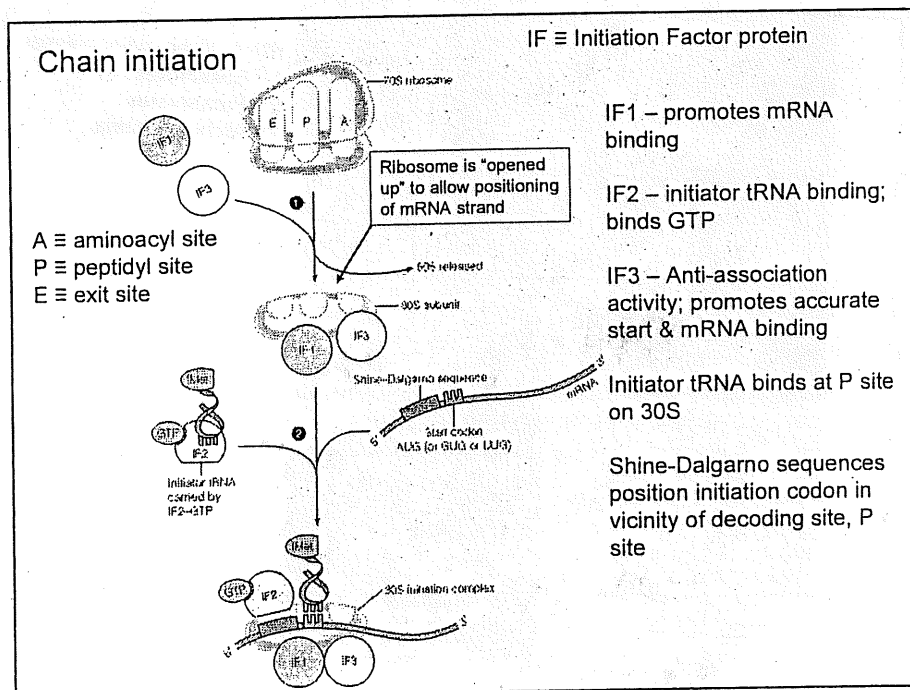
1) From ATP

- 1) Charging aa-tRNA
- 2) Eukaryotic initiation

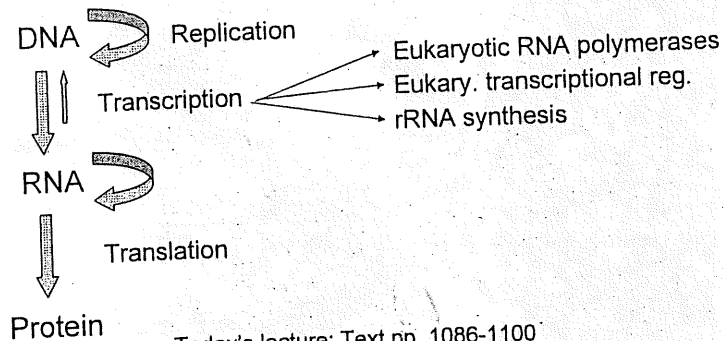
Estimated total (prokaryotes):
4 N ATP/GTP for a protein
 with N residues

2) From GTP

- 1) For binding tRNA to ribosome
 - 1) At initiation
 - 2) During elongation
- 2) For translocation of peptidyl tRNA and growing protein chain
- 3) For termination



Lecture 53: Gene Regulation in Eukaryotes



Today's lecture: Text pp. 1086-1100
 Preprinted lecture notes 105-111
 Download from
<http://biochem.med.ufl.edu/coursetemp.php?cid=44> or
<http://www.mbi.ufl.edu/facilities/msq/bch4024-notes.html>

Gene Regulation in Eukaryotes

- Increased complexity; different RNA polymerases
 - Polymerase I—pre-rRNA*
 - Polymerase II—structural pre-mRNA, some snRNA*
 - Polymerase III—pre-tRNA, 5S rRNA, other small RNAs*
- Positive vs. negative control
 - Transcription factors; hormone receptors*
- Regulation at transcription: specific factors, hormones and positive modulators of transcription
 - Transcription is precisely programmed during development and tissue differentiation. This is why there is so much interest in stem cells and dedifferentiating cells.*
- Chromatin structural changes at active sites
 - DNA is condensed in the nucleus. It has to be selectively unwound for transcription.*
- Spatial separation of transcription and translation
 - pre-mRNA is processed before export from the nucleus*
- Post-transcriptional regulation
 - Alternative splicing of transcripts (introns and exons)*
 - mRNA stability (5' capping, 3' poly A tail)*
 - Translational control (as above and protein binding)*

